

Aus der medizinischen Klinik und Poliklinik I  
mit Schwerpunkt Kardiologie, Angiologie und Pulmologie  
der Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin

**DISSERTATION**  
**DIE WIRKUNG VON**  
**PLÄTTCHENAKTIVIERENDEM FAKTOR (PAF)**  
**AUF INTRAZELLULÄRE KALZIUMKONZENTRATION**  
**UND KONTRAKTILITÄT**  
**ISOLIERTER ADULTER KARDIOMYOZYTEN**  
**DER RATTE**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von  
Thomas Hunger  
aus Frankfurt (Oder)

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. R. Felix

Gutachter:        1. Prof. Dr. S. B. Felix  
                         2. Prof. Dr. P. Persson  
                         3. Prof. Dr. H. E. Kroemer

Datum der Promotion: 15. Januar 01

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	Platelet-activating factor (PAF)	4
1.2	Wirkungen und Wechselwirkungen von PAF	8
1.3	Kardiale Wirkung von PAF	11
1.4	Wirkung von PAF auf isolierte Kardiomyozyten	11
1.5	Problemstellung	13
2	Material und Methoden	14
2.1	Isolation von Herzmuskelzellen	14
2.2	Beladung der Zellen mit FLUO-3	16
2.3	Aufbau der Perfusionskammer und Feldstimulation	17
2.4	Konfokale Laserrastermikroskopie (CLSM)	18
2.5	Bestimmung der intrazellulären Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$	19
2.6	Simultane Bestimmung von Kontraktion und $[Ca^{2+}]_i$	21
2.7	Statistische Auswertung	22
2.8	Reagenzien und Puffer	22
3	Ergebnisse	24
3.1	Kontrolle und Modulation des Systems	24
3.2	Effekt von PAF auf Kalziumtransient und Zellverkürzung	28
3.3	Antagonisierung der PAF-Wirkung durch WEB2170	32
4	Diskussion	36
4.1	Zellausbeute	36
4.2	Basale Homöostase	37
4.3	Modulierbarkeit des Messsystems	39
4.4	PAF-Wirkungen an isolierten Kardiomyozyten	41
4.5	Ausblick	46
5	Zusammenfassung	47
6	Literaturverzeichnis	48

# 1 Einleitung

## 1.1 Platelet-activating factor (PAF)

Platelet-activating factor ist das erste in der Literatur beschriebene Phospholipid mit Mediatoreigenschaften (Benveniste et al., 1977).

Am Anfang der 70iger Jahre wurde ein von Thrombozyten freigesetzter löslicher Faktor entdeckt, welcher vasoaktive Eigenschaften zeigt (Henson et al., 1970; Siraganian et al., 1970). 1972 wurde eine Substanz beschrieben, die eine Plättchenaggregation auslöst, der „platelet-activating factor (PAF)“ (Benveniste et al., 1972). 1977 gelang es, die Struktur von PAF als 1-O-Alkyl-2-azetyl-sn-glyzero-3-phosphocholin zu entschlüsseln (Benveniste et al., 1977). Die Strukturformel ist in Abbildung 1 dargestellt.

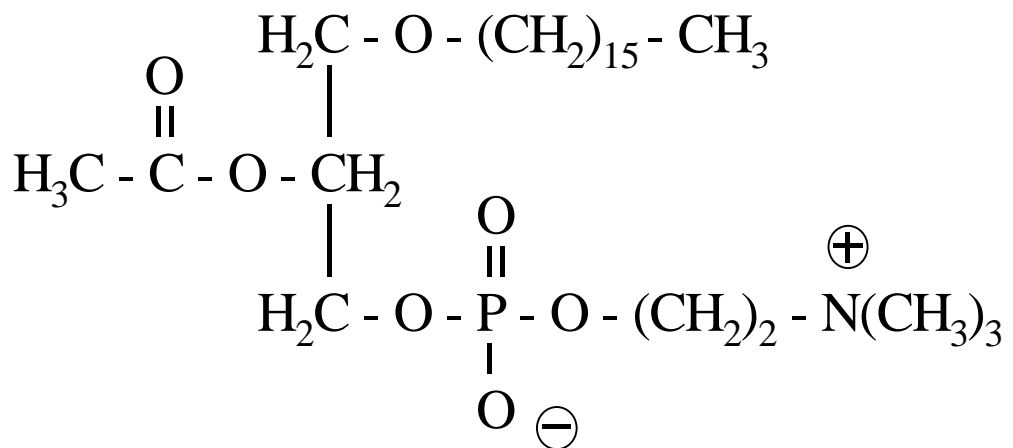


Abbildung 1: Struktur von  
1-O-Alkyl-2-azetyl-sn-glyzero-3-phosphocholin (PAF)  
(nach Benveniste et al., 1977)

Wenig später gelang die Synthese von PAF, wobei man eine Vielzahl wirksamer Substanzen mit ähnlicher Struktur entdeckte (Demopoulos et al., 1979; Blank et al., 1979). Heterogenität, Struktur, Synthese und Wirkung von PAF werden in den nächsten Abschnitten dargestellt.

Die in Abbildung 1 gezeigte Strukturformel stellt nicht das einzig mögliche plättchenaktivierende Phospholipid dar. Zur Veranschaulichung zeigt Tabelle 1 die PAF-Nomenklatur (McManus et al., 1993). Die Substanzgruppen unterscheiden sich in den Substituenten an den drei Positionen des Glycerins. Dabei zeigen Veränderungen in Position 1 den geringsten Wirkungsverlust, strukturelle Varianten in den Positionen 2 und 3 hingegen bewirken eine starke Reduktion der plättchenaktivierenden Wirkung.

Tabelle 1: Nomenklatur plättchenaktivierender Phospholipide (PAF)  
(nach McManus et al., 1993)

<b>PAF</b>	- Phospholipide mit plättchenaktivierender Wirkung, die in Position 3 einen Cholinrest haben
<b>AGEPC (Alkyl-PAF)</b>	- 1-O-Alkyl-2-azetyl-sn-glyzero-3-phosphocholin  - Die Alkylkette in Position 1 wird über Kettenlänge (x) und Anzahl der Doppelbindungen (y) bestimmt als x:y-AGEPC
<b>AGPC (Azy-PAF)</b>	- 1-O-Azyl-2-azetyl-sn-glyzero-3-phosphocholin  - Bestimmung der Azylkette wie bei AGEPC
<b>APPC (Alkenyl-PAF)</b>	- 1-O-Alk-1'-enyl-2-azetyl-sn-glyzero-3-phosphocholin  - Bestimmung der Azylkette wie bei AGEPC
<b>PAF-Analoga</b>	- Kein Cholin in Position 3  - Andere kurze Ketten in Position 2

PAF bezeichnet im weitesten Sinne Phospholipide mit plättchenaktivierenden Eigenschaften.

Die strukturelle Vielfalt von PAF wurde schon 1980 von Hanahan bei Experimenten mit IgE-sensibilisierten, basophilen Leukozyten des Kaninchens vermutet (Hanahan et al., 1980). Damals fand man zwei Arten von PAF-Molekülen: 16:0-AGEPC und 18:0-AGEPC. In nachfolgenden Versuchen wurden noch weitere, in dieser Nomenklatur als AGPC und APPC einzuordnende, Lipide entdeckt (Mueller et al., 1984).

Grundsätzlich gibt es zwei Synthesewege für PAF. Sowohl im *de novo*- als auch im *remodeling*-Syntheseweg ist das entstehende Produkt durch das Substrat definiert.

Im *de novo*-Syntheseweg wird durch das Enzym Phosphocholyltransferase eine Phosphocholylgruppe auf Position 3 des Glyzerins von Membranlipiden übertragen. Die Seitenketten 1 und 2 werden nicht durch den Syntheseweg beeinflusst, es kommt zur Synthese einer Vielzahl von Substanzen unterschiedlicher Struktur und Wirkstärke (Wykle et al., 1980).

Im *remodeling*-Syntheseweg kommt es über das Zwischenprodukt Lyso-PAF (2-Lysophospholipide) zur PAF-Synthese. Lyso-PAF kann einerseits aus PAF durch die PAF-Azetylhydrolase gebildet werden, andererseits durch aktivierte Phospholipase A<sub>2</sub> aus Membranlipiden entstehen. Hier werden die Seitenketten 1 und 3 nicht beeinflusst, was wiederum zur Vielfalt der entstehenden Produkte beiträgt. Das entstandene Lyso-PAF wird dann durch die PAF-Azetyltransferase in PAF umgewandelt.

Der erste Schritt des PAF-Abbaus ist die Deazetylierung an C-2. Da die PAF-Azetylhydrolase ubiquitär vorkommt, kann auch extrazellulär gelegenes PAF sehr schnell abgebaut werden. Die Halbwertszeit im Körper beträgt 2,5 Minuten (Graham et al., 1994).

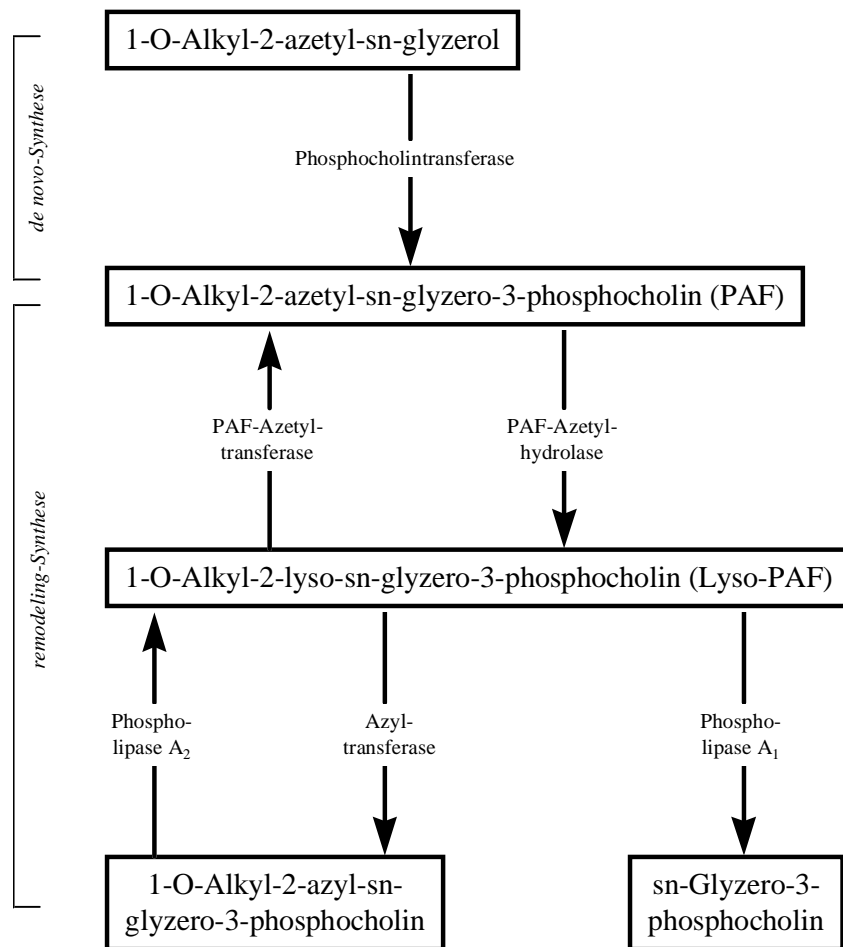


Abbildung 2: Metabolismus von PAF  
(nach Wykle et al., 1980)

Anschließend kann über die Azyltransferase ein Membranlipid gebildet werden. In Zellen mit hoher Aktivität von Phospholipase A<sub>1</sub>, z.B. in polymorphkernigen Leukozyten, wird die Fettsäure an C-1 hydrolysiert und es entstehen 1-Lyso-2-azetyl-phospholipide (Hwang, 1990). In Abbildung 2 sind PAF-Synthese und PAF-Abbau im Überblick dargestellt.

Untersuchungen am Anfang der 80iger Jahre zeigten, dass stimulierte menschliche polymorphkernige Leukozyten (PMN) 16:0- und 18:0-AGEPC freisetzen (Hanahan et al., 1980; Satouchi et al., 1983).

In weiter führenden Untersuchungen zeigte sich bald, dass aus stimulierten PMN von Mensch und Kaninchen auch andere Phospholipide der PAF-Gruppe freigesetzt werden. Zur genaueren Analyse wurde der Einbau von exogen zugeführtem [<sup>3</sup>H]-Azetat in die cholinhaltigen Phospholipide

untersucht (Ludwig et al., 1987). Peritonealmakrophagen des Kaninchens und periphere menschliche PMN wurden mit A23187, opsoniertem Zymosan oder N-formyl-methionyl-leuzyl-phenylalanin stimuliert. Mit Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) und Massenspektrometrie wurde eine große Vielfalt an AGEPC entdeckt. Ähnliche Ergebnisse erbrachten Versuche mit PMN von Ratte, Maus und Meerschweinchen (Ramesha et al., 1987).

Auch die Freisetzung von Azyl-PAF wurde untersucht. Quantitative Analysen ergaben, dass 13 - 25 % des von humanen PMN freigesetzten PAF-Gemisches aus AGPC bestehen (Mueller et al., 1984). Dieses Ergebnis warf die Frage auf, ob initial eine viel größere Menge Azyl-PAF freigesetzt wird, als messanalytisch nachgewiesen wird, da in den stimulierten Zellen auch die PLA<sub>1</sub> eine erhöhte Aktivität aufweist. Zur Klärung dieser Frage wurde den stimulierten Zellen Phenylmethylsulfonylfluorid, ein PLA<sub>1</sub>-Antagonist, zugesetzt. Dies führte zu einer 20-fach höheren Freisetzung von Azyl-PAF aus thrombinstimulierten menschlichen Plättchen (Touqui et al., 1985; Sturk et al., 1989). Triggiani et al. zeigten, dass mehr als 75 % des in menschlichen pulmonalen Mastzellen synthetisierten PAF aus AGPC besteht (Triggiani et al., 1992).

Die anderen Fraktionen des anfangs erwähnten PAF-Gemisches konnten nur vereinzelt entdeckt werden, quantitative Analysen wurden nicht durchgeführt.

In den Jahren nach der Entdeckung von PAF wurde hauptsächlich mit den wirkungsvollsten Substanzen gearbeitet: mit 16:0- und 18:0-AGEPC. Im weiteren Text bezieht sich das Kürzel PAF – wenn nicht anders angegeben – auf eine dieser beiden Substanzen oder deren Gemisch.

## 1.2 Wirkungen und Wechselwirkungen von PAF

Die Wirkungen von PAF werden über spezifische Rezeptoren vermittelt (Valone et al., 1982, 1983 & 1988; Inarrea et al., 1984; O'Flaherty et al., 1986; Prpic et al., 1989). Des Weiteren wurde festgestellt, dass innerhalb einer Spezies die Rezeptordichte variieren kann. So haben Patienten mit Sepsis oder kardialen und pulmonalen Störungen einen viel höheren Gehalt an PAF in ihren Thrombozyten und auch eine erhöhte Anzahl an PAF-Rezeptoren (Diez et al., 1990).

PAF-Rezeptoren wurden auf verschiedenen Zellen und Geweben gefunden: auf glatter Muskulatur, weißen Blutzellen, Gewebsmakrophagen und in fast jedem spezialisierten Gewebe.

Studien haben gezeigt, dass G-Proteine in die Vermittlung der PAF-Wirkung involviert sind (Haslam & Vanderwel, 1982; Homma & Hanahan, 1988). Die Bindung von PAF an den Oberflächenrezeptor stimuliert GTPase-Aktivität. Gleichzeitig erhöht das Vorhandensein von GTP und Analoga die PAF-Sensitivität. Teilweise kann die PAF-Wirkung durch Pertussistoxin (PTX) blockiert werden, die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration wird aber nicht stark davon beeinflusst (Schlondorff et al., 1989). Die partielle PTX-Sensitivität weist darauf hin, dass bei der Wirkvermittlung rezeptorabhängige inhibitorische  $G_i$ -Proteine involviert sein müssen, welche die katalytische Untereinheit der Adenylatzyklase hemmen. Es kommt zur verminderten Synthese von cAMP, die Aktivität der Proteinkinase A (PKA) sinkt.

PAF aktiviert die  $PLA_2$  (McManus et al., 1980). Das führt zur direkten Freisetzung von Arachidonsäure und Lyso-PAF. Aus der Arachidonsäure werden weiter Thromboxane, Leukotriene und Prostaglandine gebildet. Dieser Effekt lässt sich durch PTX blockieren.

Die Protein-Tyrosinkinase (PTK) wird von PAF aktiviert. PTK ist ein Enzym mit vielfältigem Wirkspektrum. Es ist in die G-Proteinkaskade eingebaut, aber auch Teil der Signalkette von Wachstumsfaktoren. Es aktiviert Phospholipasen und Phosphokinasen. Die PLC wird sowohl durch PTK als auch durch PAF selbst aktiviert (Brass et al., 1988). Dieses Enzym katalysiert die Umwandlung von Phosphoinositolbisphosphat ( $PIP_2$ ) zu Diazylglyzerol (DAG) und Inositoltrisphosphat ( $IP_3$ ).  $IP_3$  führt zur Freisetzung von Kalziumionen aus dem endoplasmatischen Retikulum, DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC). Auch ein weiteres Enzym, mitogenaktivierte Proteinkinase-Kinase (MAPK), wird durch PAF aktiviert.

Sowohl MAPK als auch PTK sind in die Regulation der Genexpression von Mediatoren involviert. PAF steigert über diese beiden Enzyme die Expression von Protoonkogenen sowie die Produktion von IL-1, IL-3, IL-6 und TNF. PAF steigert außerdem die Expression seines eigenen Rezeptors (Chao & Olson, 1993).

In Abbildung 3 ist ein vereinfachtes Schema der bisher bekannten molekularen Wirkungen von PAF abgebildet.



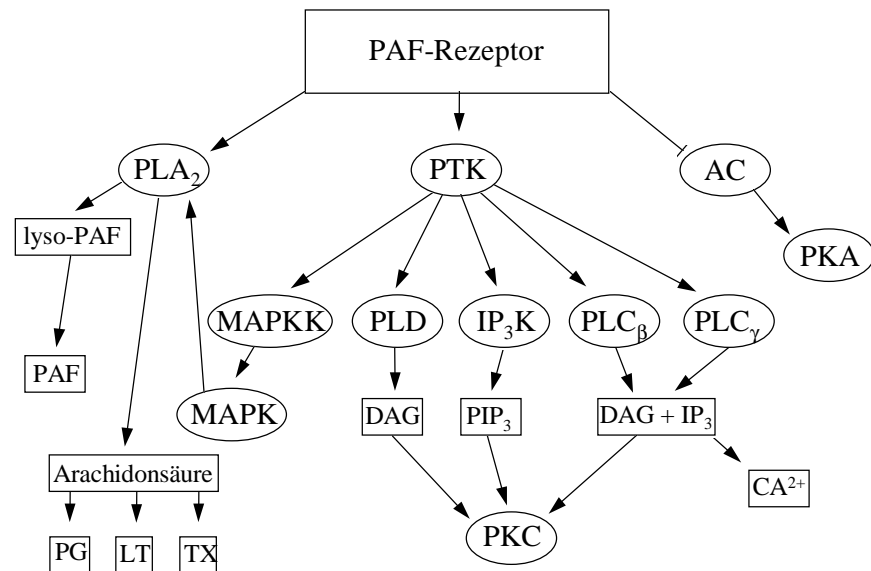


Abbildung 3: Rezeptorvermittelte Wirkungen von PAF  
(nach Izumi & Shimizu, 1995; PG-Prostaglandine; LT-Leukotriene;  
TX-Thromboxane; MAPKK-Mitogenaktivierte Proteinkinase-Kinase;  
AC-Adenylatzyklase, PTK-Proteintyrosinkinase)

Bei der Untersuchung der Einwirkung von Nicht-AGEPC auf den Rezeptor wurde keine hohe Spezifität für 1-Azyl-2-azetyl-GPC festgestellt. Auch war die Wirkung 300-fach niedriger als die von AGEPC (Satouchi et al., 1985). Es wurde vermutet, dass die beobachtete Wirkung nicht über den PAF-Rezeptor zustande kommt, da keine direkte Interaktion nachgewiesen werden konnte.

1981 bezeichnete Benveniste die von ihm benannte Substanz als „den derzeit stärksten bekannten Vasokonstriktor“ (Benveniste et al., 1981). Neben der vasokonstriktorischen Wirkung führt PAF zu anaphylaktischer Hypersensibilisierung, Bronchokonstriktion und kataboler Stoffwechsellaage (Koltai et al., 1991). Ein Auszug aus den bekannten PAF-Wirkungen ist in Tabelle 2 wiedergegeben.

Tabelle 2: Wirkungen und Wechselwirkungen von PAF (nach Koltai et al., 1991)

<b>Struktur</b>	<b>PAF-Wirkung</b>
<b>Thrombozyten</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Plättchenaggregation und Erhöhung der <math>[Ca^{2+}]_i</math></li> <li>-Freisetzung von Histamin, Serotonin und PAF</li> </ul>
<b>PMN</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Chemotaxis auf PAF</li> <li>-Verstärkte Elastase-Ausschüttung aus sauren Granula</li> <li>-Verbesserte Migration</li> <li>-PAF-Synthesestimulation, Freisetzung von Arachidonsäure und deren Metaboliten</li> <li>-Geringe Wirkung von spezifischen PAF-Rezeptorantagonisten</li> </ul>
<b>Eosinophile Granulozyten</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Zellakkumulation in der Bronchialschleimhaut</li> <li>-Ausschüttung von Arachidonsäure und Leukotrienen</li> <li>-Verbesserte Chemotaxis</li> <li>-Geringe Wirkung von spezifischen PAF-Rezeptorantagonisten</li> </ul>
<b>Monozyten/ Makrophagen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Freisetzung von Thromboxan <math>A_2</math> durch rezeptorfreien Zellkontakt</li> <li>-Starke, irreversible PAF-Wirkung mit Freisetzung von Arachidonsäure und deren Folgeprodukten sowie PAF-Neusynthese</li> <li>-Circulus vitiosus durch Effekte intrazellulären PAFs</li> </ul>
<b>Endothelzellen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Erhöhung der Flüssigkeitssequestration in das umliegende Gewebe</li> <li>-Freisetzung von Entzündungsmediatoren mit vermehrter Plättchenaggregation, Migration von Entzündungszellen</li> <li>-Starke PAF-Produktion</li> </ul>
<b>Gesamt-organismus</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Generalisierte Vasokonstriktion</li> <li>-Modulation der pulmonalen Hyperreaktivität, Bronchokonstriktion</li> <li>-Katabole Stoffwechsellage</li> <li>-In hohen Dosen Ausbildung von Herz-, Nieren-, Darm- und Pankreasinfarkten, ischämischem Insult und respiratorischer Insuffizienz</li> </ul>

### **1.3 Kardiale Wirkung von PAF**

Das Herz ist ein stark durchblutetes Organ. Zirka 90 % des Myokardvolumens besteht aus Herzmuskelzellen, die übrigen 10 % verteilen sich auf Bindegewebe und Gefäße. In akuten inflammatorischen und ischämischen Situationen ist das Herz aufgrund seines stetig hohen Blutbedarfs und seines Gefäßreichtums besonders betroffen.

Eine akute Vasokonstriktion wurde in In-vitro-Studien am isolierten Herzen nachgewiesen (Goldstein et al., 1981; Stewart & Piper, 1986; Stahl & Lefer, 1987; Felix et al., 1990; Abete et al., 1992; Mentz et al., 1992). In sehr niedrigen Dosen wurden sowohl Vasodilatation (Feuerstein et al., 1984) als auch Vasokonstriktion (Jackson et al., 1986; Metha et al., 1986) beobachtet. In diesen Studien konnte aber auch gezeigt werden, dass die Vasodilatation kein direkter PAF-Effekt und thrombozytenabhängig ist.

Bei Ratten, Schweinen und Hunden lässt sich der Effekt von PAF durch Indomethazin, Lipoxygenase-Inhibitoren und PAF-Antagonisten wie BN52021 und Ginkgolid B stark abschwächen. Bei Meerschweinchen dagegen war der PAF-Effekt gegen  $\text{TXA}_2$ -Antagonisten, LT-Antagonisten und Zyklooxygenase-Inhibitoren stabil und nur durch spezifische PAF-Rezeptorantagonisten abzuschwächen. Bei dieser Spezies muss es also einen direkten PAF-Wirkort an der Gefäßmuskulatur geben (Saeki et al., 1985; Taniere et al., 1989; Stahl et al., 1987).

Braquet & Hosford (1989) untersuchten das Verhalten isolierter Koronararterien-Streifen und fanden heraus, dass unter Hypoxie eine biphasische Reaktion stattfindet: eine schnelle Kontraktion gefolgt von einem lang anhaltend erhöhten Tonus. Dieser Effekt ließ sich durch Präinkubation mit PAF verstärken.

Zur PAF-Wirkung auf das Myokard direkt gibt es in der Literatur unterschiedliche Angaben. Manche Beobachtungen zeigen positive (Kamitani et al., 1984; Nakaya & Tohse, 1986), andere negative (Levi et al., 1984) oder auch bivalente (Camussi et al., 1984; Alloatti et al., 1986; Diez et al., 1990) inotrope Reaktionen des Herzmuskels.

Versuche von Robertson et al. an humanen Myokardstreifen zeigten einen konzentrationsabhängig negativ inotropen Effekt, der im Verlauf von Minuten eintrat (Robertson et al., 1987, 1988).

### **1.4 Wirkung von PAF auf isolierte Kardiomyozyten**

Herzarbeit drückt sich in Pumpleistung pro Zeit oder Anspannungsgeschwindigkeit der Myokardwand aus. Das ist das Ergebnis des Kontrahierens der Kardiomyozyten als kleinster funktioneller Einheit.

Das Myokard besteht aus einem Geflecht von Zellen, welche durch die Glanzstreifen sowohl voneinander getrennt als auch fest miteinander verbunden sind. Die kontraktionsfähigen Fibrillen in den Muskelzellen sind fest in diesen Scheiben verankert. Kommt es zur elektrischen Erregung des Herzens, werden die Impulse über das Erregungsleitungssystem zu allen Herzmuskelzellen weitergeleitet. Als Folge kontrahieren die Zellen und es kommt zu einer Verkürzung und Verdickung des Myokards. Für die Kontraktion sind zwei intrazelluläre Faktoren wichtig: Kalziumionen und ATP.

Kommt es zur Erregung der Zelle, wird die Membran depolarisiert. Spannungsabhängige Kalziumkanäle öffnen sich, es kommt zu einem Einstrom von Kalziumionen sowohl aus dem Extrazellularraum als auch aus den sarkoplasmatischen Zisternen in das Zytosol (Systole). Hier binden die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen an das Tropomyosin. Durch Konfigurationsänderungen werden Bindungsstellen für Myosin auf dem Aktinfilament freigelegt. Unter ATP-Verbrauch kommt es jetzt zu aktiven Bewegungen des Myosinköpfchens und zu Sarkomerverkürzung, bis die Kalziumionen wieder aus der Zelle entfernt sind (normale Kontraktion) oder bis alles ATP verbraucht ist (Ischämie). In der nun folgenden Relaxationsphase (Diastole) kommt es zu einem Zurückgleiten der Filamente und zu einer Regeneration von ATP.

Für die Stärke und Dauer einer Kontraktion ist – ausreichende Energiezufuhr vorausgesetzt – die Stärke des Kalziumeinstromes von entscheidender Bedeutung. Weiterhin bedingt die Affinität der Kalziumionen zu den Bindungsstellen an den kontraktilen Filamenten die Stärke der Kontraktion.

PAF-Effekte auf Kardiomyozyten wurden erstmals von Massey et al., 1991 untersucht. Hier wurde bei neonatalen kultivierten sowie frisch isolierten adulten Kardiomyozyten eine Verringerung der Zellverkürzung festgestellt (Massey et al., 1991). Die beobachteten Effekte erforderten hohe PAF-Konzentrationen ( $10^{-8}$ - $10^{-6}$  M), waren aber konzentrationsabhängig.

Delbridge et al., (1993) stellten an frisch isolierten Kardiomyozyten der adulten Ratte einen konzentrationsabhängig negativen PAF-Effekt auf die Kontraktion fest. Hier lagen die verwendeten PAF-Konzentrationen im Bereich von  $10^{-11}$ - $10^{-7}$  M. Diese Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass der Einsatz von WEB2086, einem spezifischen PAF-Rezeptorantagonisten, eine signifikante Reduktion des PAF-Effektes bewirkt (Delbridge et al., 1993). WEB2086 selbst hatte einen positiv inotropen Effekt.

An fetalen humanen und Hühnerkardiomyozyten wurde mittels Voltage-Clamp-Technik eine PAF-induzierte Erhöhung des Kalziumeinstromes festgestellt (Bkaily et al., 1996). Es wurden PAF-Konzentrationen von  $10^{-9}$ - $10^{-7}$  M verwendet, der Effekt ließ sich durch den Einsatz des spezifischen PAF-Rezeptorantagonisten WEB2170 inhibieren. Es wurde auch eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration erwähnt, diese unter Anwendung eines Fluoreszenzfarbstoffes gewonnenen Daten wurden aber noch nicht detailliert veröffentlicht.

## **1.5 Problemstellung**

Bei der Untersuchung am isolierten Herzen wird es immer Differenzierungsprobleme geben, ob die beobachteten Effekte bestimmter Pharmaka auf einer Beeinflussung der Herzkranzgefäße oder der Herzmuskelzellen beruhen.

Bisher wurden Effekte von PAF an isolierten Herzmuskelzellen nur anhand der Zellverkürzung dargestellt. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, ein System zur simultanen Messung von Zellverkürzung und Kalziumtransient am isolierten Kardiomyozyten zu etablieren. So kann man einerseits die PAF-Wirkung an den Koronararterien ausschließen, andererseits ist es möglich zu differenzieren, ob die bekannte negativ inotrope Wirkung von PAF auf einer Inhibition des Kalziumtransienten beruht oder ob es durch PAF zu einer Desensibilisierung der kontraktilen Filamente kommt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Isolation von Herzmuskelzellen

Zur Gewinnung isolierter Kardiomyozyten wurde eine retrograde enzymatische Perfusion von Rattenherzen durchgeführt. Dies geschah mit einer sogenannten Langendorff-Anlage (Abbildung 4, verändert nach Langendorff, 1895).

#### Aufbau und Vorbereitung der Anlage

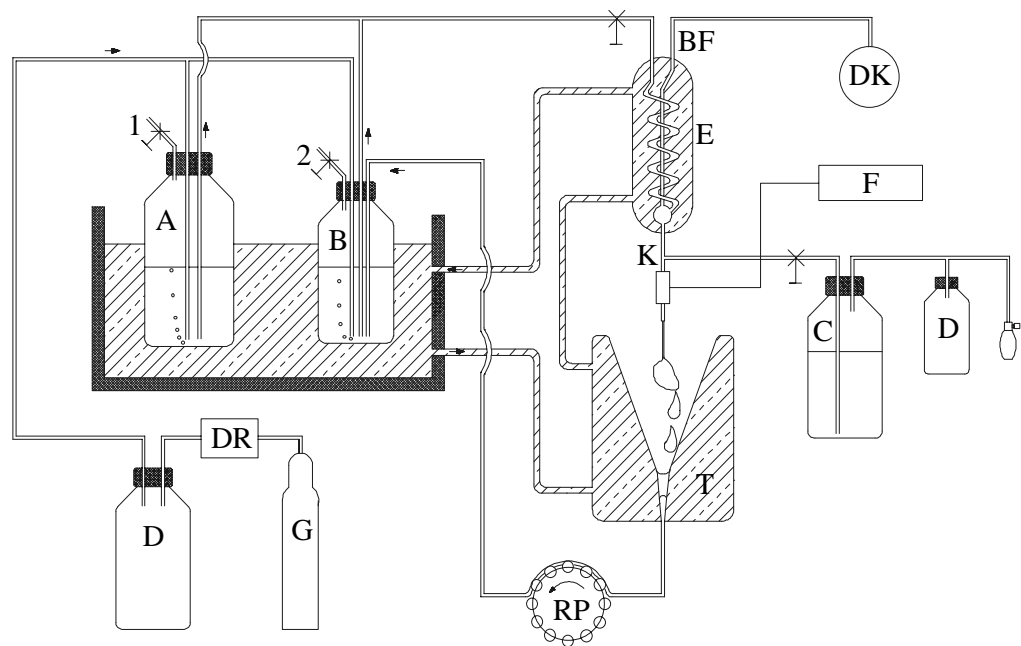


Abbildung 4: Perfusionsapparatur zur Isolierung adulter Kardiomyozyten (modifiziert nach Langendorff, 1895 und Dendorfer, 1990; A-KHP, B-Enzymlösung, BF-Blasenfalle, C-Hochkaliumpuffer, D-Druckausgleichsbehälter, DK-Druckkontrolle, DR-Druckregulation, E-Wärmetauscher, F-Flussmessung, G-Gasflasche, K-Konus, RP-Rollenpumpe, T-Trichter, 1,2-Begasungsregler)

Die Anlage wurde wie abgebildet mit geschlossenen Klemmen aufgebaut. Erster Schritt war die Füllung des Schlauches vom Gefäß C zum Konus K. Danach begann die Begasung mit Carbogengas (95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>) über den Druckausgleichsbehälter D, so dass sich in den Gefäßen A und B ein Druck aufbaute. Nun wurden erst der Schlauch von Gefäß B und dann der von Gefäß A zum Erwärmer E gefüllt. Anschließend wurden aus dem Gefäß A noch der ganze Erwärmer und die Blasenfalle BF gefüllt. Der Umwälzthermostat wurde bei 37 °C aktiviert. Anschließend wurde in den Gefäßen A und B eine gleichmäßige Begasung über die Klemmen 1 und 2 eingestellt. Nach einer Begasung von 30 Minuten war die Anlage betriebsbereit.

## Enzymatische Isolation von Kardiomyozyten

Für die Versuche wurden 200 - 250 g schwere, weibliche Wistar-Ratten aus der Zucht des Tierstalls der Charité verwendet. Die Tiere wurden durch Nackenschlag getötet. Nach Eröffnung des Thorax wurde das Herz bis zum Stillstand mit auf 4 °C temperierter physiologischer Kochsalzlösung umspült, weiträumig exzidiert und in ein Glas mit 4 °C physiologischer Kochsalzlösung gebracht. Die Aorta wurde schonend freipräpariert, unterhalb des Abgangs des Truncus brachiocephalicus durchtrennt und mit einem Faden an dem PE-Konus der Perfusionsapparatur angebracht. Nun begann die Perfusion mit 37 °C Krebs-Henseleit-Puffer (KHP), wobei es nach zirka 1 Minute zur Kardioplegie kam. Die Zusammensetzung der Puffer wird in Kapitel 2.6 erläutert. Der Perfusionsdruck wurde während der gesamten Versuchsdauer auf 50 mbar gehalten. Das abtropfende Perfusat wurde verworfen. Nach 8-minütiger Perfusion mit KHP wurde auf die Kollagenaselösung umgeschaltet.

Während der 50-minütigen Enzymperfusion wurde über den Trichter T das Perfusat gesammelt und mit Hilfe der Pumpe P in das Gefäß B rezirkuliert. Dabei musste die Pumpleistung der steigenden Perfusionsrate bei Bedarf angepasst werden.

Nach der Enzymperfusion schloss sich ein Waschschrift an. Dazu wurde die Enzymlösung aus dem Herzen bei 25 °C mittels Hochkaliumpuffer ausgewaschen. Nach 5 Minuten war dieser Schritt abgeschlossen.

Das Herz wurde nun in eine Petrischale überführt, mit einem Skalpell von Vorhöfen, großen Gefäßen und Bindegewebe freipräpariert und in zirka 1 mm große Stücke zerschnitten. Dieser Gewebestreifen wurde in 10 ml Hochkaliumpuffer bei Raumtemperatur in einem Trichter mit Luft umgewirbelt. Nach 5 Minuten wirbeln wurden die stark dissoziierten Zellen durch ein Netz mit einer Maschenweite von 200 µm gefiltert und bei 4 °C aufbewahrt.

Mit der beschriebenen Perfusionsapparatur konnten aus Rattenherzen in 90 Minuten Präparate mit hoher Muskelzellichte gewonnen werden. Dabei zeigte sich die Verwendung der Kollagenase als am wirkungsvollsten. Der Einsatz von Albumin und die Zugabe von 10 mM K<sup>+</sup>-Ionen zum KHP verbesserten die Zellausbeute und machten die Ergebnisse reproduzierbar. In 47 Isolationen konnten je  $4,9 \pm 0,3 \times 10^6$  Zellen pro Herz gewonnen werden.

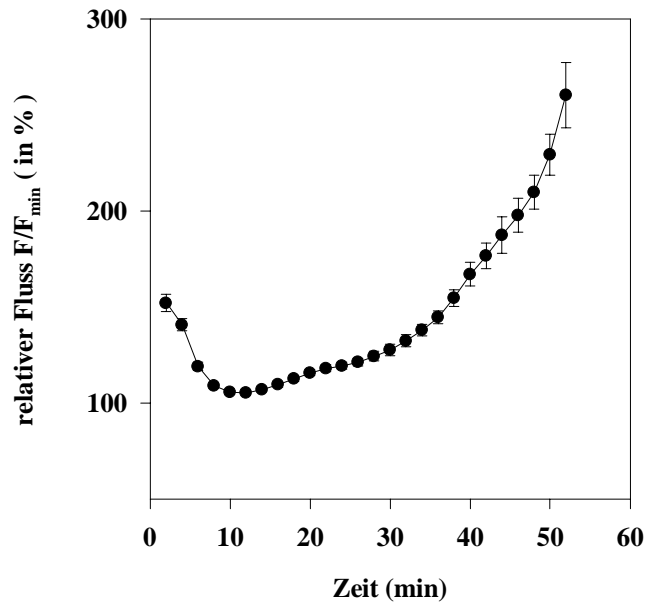


Abbildung 5: Relativer Perfusionsfluss während der Isolation (n=47)

Während der Isolation wurde der Fluss der Enzymlösung fortlaufend registriert. In den ersten 10 Minuten der Perfusion mit Enzymlösung kommt es zu einer relativen Abnahme des Flusses, was vermutlich auf ein Ödem des Endothels, Koronarkonstriktion und auf extravasale Sequestration von Flüssigkeit zurückzuführen ist. Die nachfolgende Phase ist durch eine ansteigende Perfusion aufgrund der zunehmenden Gewebszerstörung gekennzeichnet.

In Abbildung 5 sind die unter der Perfusion gemessenen relativen Koronarflusswerte dargestellt.

## 2.2 Beladung der Zellen mit FLUO-3

Nach einer Stunde Ruhe bei 4 °C konnten die Zellen in die Experimentierkammern (Nalgene Nunc Int. Corp., Naperville, IL, U.S.A.) überführt werden. Diese wurde zuvor eine Stunde lang mit 6 µg pro cm<sup>2</sup> Laminin (Harbor Bio-Products, Norwood, MA, U.S.A.) inkubiert. Es wurden zirka 600 Zellen pro cm<sup>2</sup> eingesetzt und mit Hochkaliumpuffer ein Kammervolumen von 600 µl eingestellt. Die Zellen wurden nun für 30 Minuten mit FLUO-3 AM (Azetomethylester), einem Kalzium-Fluoreszenzfarbstoff, in einer Konzentration von 4 µM im Dunkeln inkubiert. In dieser Zeit drang der Farbstoffester in die Zellen ein und wurde dort von Esterasen gespalten. Die polaren Spaltprodukte konnten nun nicht mehr aus der Zelle herausdiffundieren. Danach wurde die Flüssigkeit aus der Kammer abgesaugt und mit dem Versuchspuffer erneut ein Badvolumen von



600  $\mu$ l eingestellt. Nach weiteren 30 Minuten Inkubationszeit konnten die Zellen für Versuche benutzt werden.

### 2.3 Aufbau der Perfusionskammer und Feldstimulation

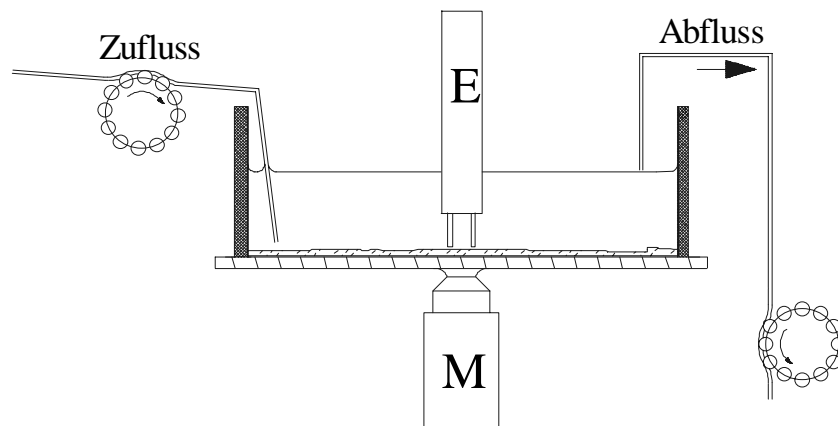


Abbildung 6: Perfusionskammer zur Vermessung isolierter Kardiomyozyten am konfokalen Mikroskop (E-Elektroden zur Feldstimulation, M-Objektiv des Mikroskops)

Für die Versuche wurde eine Perfusionskammer benutzt, wie sie in Abbildung 6 dargestellt ist. Der Zufluss erfolgte verwirblungsarm unter der Flüssigkeitsoberfläche, durch die Höhe der Abflusskanüle wurde ein Kammervolumen von 600  $\mu$ l eingestellt. Die elektrische Stimulation der Zellen erfolgte über die Elektroden mit einer Spannung von 10 - 30 V, einer Frequenz von 0.5 Hz und einer Pulsdauer von 2 ms. Die Spannung lag jeweils 5 V über der minimalen Erregungsspannung. Die Myozyten wurden mit 1 ml Versuchspuffer pro Minute bei 25 °C superfundiert. Diesem System wurden nun die zu untersuchenden Substanzen zugesetzt.

Durch das beschriebene Isolationsprotokoll wurde eine so reine Herzmuskelzellfraktion gewonnen, dass störende Effekte anderer Zellen in der Messkammer ausgeschlossen werden konnten.

## 2.4 Konfokale Laserrastermikroskopie (CLSM)

Ziel des Messaufbaus sollte es sein, die in der isolierten Zelle vorliegende intrazelluläre Kalziumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) simultan zur Zellverkürzung zu bestimmen. Dafür bietet sich das Verfahren der konfokalen Mikroskopie an, welches in Abbildung 7 illustriert ist.

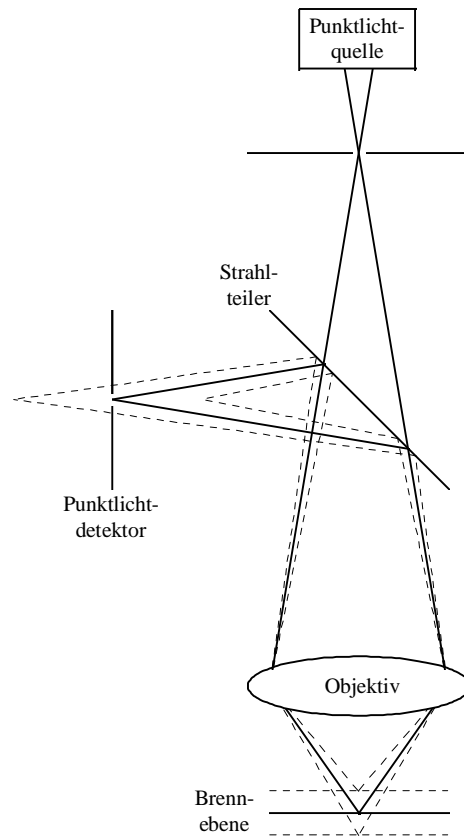


Abbildung 7: Das Prinzip der konfokalen Mikroskopie  
(nach Engelhard & Knebel, 1993)

In der Fluoreszenzmikroskopie werden solche Objekte abgebildet, die sich spezifisch anregen lassen. Streulicht aus verschiedenen Ebenen führt zu Unschärfe. Das konfokale Verfahren der mikroskopischen Abbildung schaltet diese Probleme aus: das aus der Fokusebene emittierte Licht wird durch einen Strahlteiler in Richtung des Punktlichtdetektors umgelenkt. Bei exakter Einstellung der Ebenen wird hier nur noch das direkt aus der Brennebene stammende Licht nachgewiesen, alle anderen Strahlen werden ausgeblendet. Die Rasterung des Objekts ermöglicht eine schonendere Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes, die Verwendung monochromatischen Lichtes verringert die benötigte Lichtstärke. Die Verwendung eines akusto-optischen Detektors (AOD) ermöglicht eine vergleichsweise gute zeitliche Auflösung. Letztendlich hängt die Schichtdicke nur von der Wellenlänge des verwendeten Lichtes und der Größe der Blenden ab.

Bei den Experimenten zur vorliegenden Arbeit kam ein Odyssey XL konfokales Laserrastermikroskop (Noran Instruments, Middleton, WI, U.S.A.) zur Anwendung. Die Experimentalkammern wurden auf einem Nikon Diaphot TDM Mikroskop (Nikon, Tokyo, Japan) angebracht und mit einem 40-fach Immersionsölobjektiv (plan apo X40, NA 1.0) betrachtet und vermessen. Die Messdaten wurden auf der Festplatte einer Indy-Workstation (Silicon Graphics, Mt. View, CA, U.S.A.) gespeichert und ausgewertet (XMGR-Tool und 2D-Aquisition-Tool, Silicon Graphics). Die Zellen wurden mit der 488 nm-Linie eines Argonlaser angeregt, die Fluoreszenzemission wurde bei Wellenlängen von mehr als 515 nm mit einer Frequenz von 30 Bildern pro Sekunde detektiert.

In der Perfusionskammer waren die isolierten Zellen unter Feldstimulation bis zu 20 Minuten anregbar und zeigten eine gleichbleibende Kontraktion, wohingegen der Kalziumtransient geringfügig abnahm. Letzteres war bei erhöhter Laserintensität vermehrt zu beobachten, so dass es sich hier um Bleicheffekte handeln musste. Bei Anwendung einer konstanten Laserleistung von 13 % der maximalen Energie waren diese Effekte minimal und reproduzierbar. Als Kriterium für den Beginn eines Messvorgangs wurde definiert, dass die avisierte Zelle 80 Sekunden lang konstant stimulierbar sein musste und in dieser Zeit keine Veränderungen des Kalziumtransienten auftreten durften. Dann war davon auszugehen, dass die Zelle über weitere 10 Minuten konstant stimulierbar sein würde.

## **2.5 Bestimmung der intrazellulären Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$**

Die vorbereiteten Zellen – wie in Kapitel 2.2 beschrieben – wurden in den Strahlengang des Mikroskops eingebracht und fokussiert. Nach Einbringen der Elektroden begann die Stimulation. Die Kontrolle der Kontraktionen erfolgte mittels konventioneller Durchlichtmikroskopie. Unmittelbar vor Beginn der Registrierungen wurde der Strahlengang des CLSM eingekoppelt.

Die intrazelluläre Kalziumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) konnte aus den fortlaufend bestimmten Fluoreszenzwerten errechnet werden. Dazu musste die Zelle am Ende der Messung zur maximalen  $[Ca^{2+}]_i$  gebracht werden. Das gelang über den Einsatz von 1  $\mu$ M 4-Bromo-Kalziumionophor (A23187). Diese Substanz ermöglicht einen maximalen Einstrom von Kalzium in die Zelle. Zum Erreichen einer minimalen  $[Ca^{2+}]_i$  wurden Konzentrationen von 100 mM Manganchlorid und 0,128 mM Digitonin verwendet. Die Registrierung der Fluoreszenzwerte eines Kontrollversuchs mit anschließender Eichung sowie Einzelbilder der observierten Zelle in den einzelnen Fluoreszenzzuständen sind in Abbildung 8 wiedergegeben.

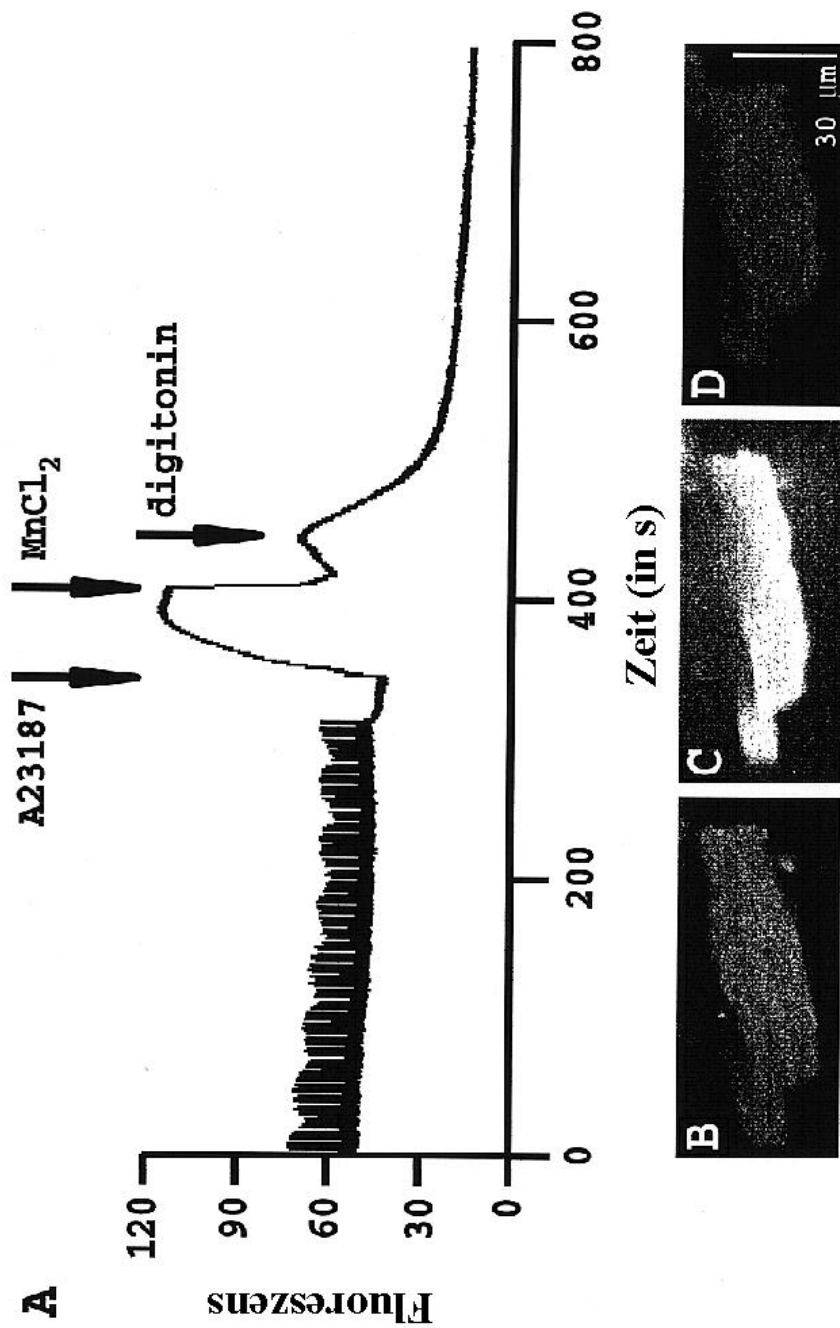


Abbildung 8: Kontinuierliche Fluoreszenzmessung und Eichung einer Einzelzelle (A), Bild einer Einzelzelle in diastolischer (B), maximaler (C) und minimaler (D) Fluoreszenz

Der verwendete Farbstoff FLUO-3 hat im Komplex mit  $\text{Ca}^{2+}$  eine Gleichgewichtskonstante  $K_d$  von 400 nM (Minta et al., 1989). Man kann die intrazelluläre Kalziumkonzentration aus

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \times (F - F_{\min}) / (F_{\max} - F)$$

errechnen, wobei  $F$  die am zu errechnenden Zeitpunkt vorkommende Fluoreszenz ist,  $F_{\max}$  die maximal erreichte Fluoreszenz und  $F_{\min}$  die minimale Fluoreszenz (Minta et al., 1989; Cannell et al., 1994).

Aus der Differenz zwischen systolischer und diastolischer intrazellulärer Kalziumkonzentration wurde der Kalziumtransient errechnet, der somit die Änderung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  während der Kontraktion darstellt.

Bei den von uns durchgeführten Untersuchungen waren die basalen intrazellulären Kalziumkonzentrationen systolisch  $524 \pm 33$  nM und diastolisch  $123 \pm 16$  nM (jeweils  $n=30$ ). Bei den basalen Untersuchungen wurde eine konstante periodische Schwankung des Kalziumtransienten festgestellt. Hier handelt es sich um eine mit der Periodendauer von 41 Sekunden sinusförmige Veränderung der Amplitude des Kalziumtransienten. Diese war in allen Zellen reproduzierbar, allerdings in unterschiedlich starker Ausprägung. Aufgrund dieser Beobachtung wurde die Messung des Kalziumtransienten immer im Gipfelpunkt der Schwingung durchgeführt. In Abbildung 8 ist diese Schwingung zu erkennen.

## 2.6 **Simultane Bestimmung von Kontraktion und $[\text{Ca}^{2+}]_i$**

Für die gleichzeitige Bestimmung von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  und Zellverkürzung wurden aus der fortlaufenden Registrierung alle zwei Minuten digitale Bildsequenzen von je 120 Bildern ( $640 \times 480$  Pixel) von der zu vermessenden Zelle angefertigt. Die Bestimmung der Zellverkürzung erfolgte mittels der 2D-Software von Silicon Graphics (2D-Aquisition-Tools). Die basale Zelllänge war  $112 \pm 2$   $\mu\text{m}$ , die Zellverkürzung  $5,2 \pm 0,2$  % (jeweils  $n=30$ ).

Die zeitgleichen Änderungen der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  konnten aus der Bildsequenz wie in Kapitel 2.5 beschrieben errechnet werden.

Die Datensätze der Kontraktionen konnten aufgrund der technischen Gegebenheiten nur alle 2 Minuten erhoben werden, dazwischen wurde aus der fortlaufenden Registrierung noch die minütliche  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  berechnet.

## 2.7 Statistische Auswertung

Um die individuellen Zellunterschiede in basaler  $[Ca^{2+}]_i$  und Zelllänge bei der Auswertung zu nivellieren, wurden alle Daten als relative Werte angegeben. Dazu wurde jeweils die Differenz aus systolischem und diastolischem Wert (Kalziumtransient bzw. Zellverkürzung) gebildet und als Prozent des am Messbeginn ermittelten Ausgangswertes wiedergegeben. Alle Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler wiedergegeben. Die Signifikanztestung erfolgte mit dem One Way ANOVA-Test, wobei alle Werte  $p < 0.05$  als signifikant gewertet wurden.

## 2.8 Reagenzien und Puffer

In Tabelle 3 sind alle verwendeten Puffer in ihrer Zusammensetzung aufgezeigt. Soweit nicht anders erwähnt, wurden die Substanzen von SIGMA Chemicals, Deisenhofen, Deutschland bezogen.

Tabelle 3: Zusammensetzung der verwendeten Puffer

Substanzen ( in mM )	modifizierter Krebs-Henseleit- Puffer (KHP)	Hochkaliumpuffer	Versuchspuffer
NaCl	120		117
Natriumpyruvat		5	
KCl	8,8	115	2,8
MgSO <sub>4</sub>	1,1		
MgCl <sub>2</sub>		4	0,6
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2	5	1,2
Glukose	8,3	20	20
Taurin	20	20	
NaHCO <sub>3</sub>	24,8		
Creatin	10		
Ribose	4		
Adenin	0,01		
Allopurinol	0,1		
EGTA		0,5	
HEPES		20	10
CaCl <sub>2</sub>			1,2
eingestellter pH-Wert	7,4 mit HCl	7,3 mit KOH	7,3 mit NaOH

Als Digestionslösung wurde 50 U/ml Kollagenase Typ CLS II (Worthington, Freehold, NJ, U.S.A.) in KHP verwendet. Der Enzymlösung wurde 0,23 Vol.% Rinderalbumin (BSA) zugesetzt.

Die Beschichtung der Messkammern erfolgte mit Maus-Laminin (Harbor Bio-Products, Norwood, MA, U.S.A.).

4  $\mu$ M FLUO-3 AM in Hochkaliumpuffer wurde zur Farbstoffbeladung der Zellen verwendet. Eine Stammlösung von 1 mM Fluo-3 AM wurden in DMSO aliquotiert.

1  $\mu$ M 4-Bromo-Kalziumionophore (A23187) wurde zum Erreichen der maximalen Fluoreszenz verwendet, 100 mM Manganchlorid und 0,128 mM Digitonin wurden zum Erreichen der minimalen Fluoreszenz verwendet (siehe auch Abbildung 8).

Als Testsubstanzen kamen Isoprenalin und Verapamilhydrochlorid zur Anwendung.

Effektorsubstanz war PAF 16:0-AGEPC. Eine Stammlösung von 10 mM PAF wurden in DMSO aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Als spezifischer PAF-Antagonist wurde WEB 2170 (5 - ( 2 - chlorophenyl ) - 3,4 -dihydro - 10 - methyl - 3 - ( ( 4-morpholinyl ) karbonyl ) - 2H,7H - zyklopenta ( 4,5 ) thieno [3,2-f] [1,2,4] triazolo - [4,3-a] [1,4] diazepin) eingesetzt (Boehringer Ingelheim, Heidelberg, Germany).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Kontrolle und Modulation des Systems

Zur Charakterisierung des entwickelten Messsystems war es notwendig, die kontrahierenden Zellen auf ihre Funktion und auf ihr Ansprechen auf die externe Verabreichung von Testsubstanzen hin zu untersuchen. Die gute Grundfunktion der Zellen ist per se durch eine stabile Kontraktion über mehr als 10 Minuten nachgewiesen. Als Testsubstanzen wurden Isoprenalin und Verapamil gewählt, weil es zu beiden Medikamenten gut dokumentierte Wirkungsspektren gibt, so dass ein Vergleich der erzielten Ergebnisse mit denen internationaler Arbeitsgruppen möglich ist.

#### Wirkung von Isoprenalin auf Kalziumtransient und Zellverkürzung

Isoprenalin entfaltet seine spezifische positiv inotrope Wirkung durch den  $\beta_1$ -Rezeptor. Es kommt zu einem Anstieg intrazellulären cAMPs, dies führt über Zwischenschritte zur Aktivierung der Kalziumkanäle, die während der systolischen Erregung der Zelle mehr und schneller Kalzium einschleusen, dieses dann aber in der Diastole auch wieder schneller aus der Zelle transportieren.

Der Effekt von Isoprenalin auf die isolierte Zelle tritt sofort ein. Unmittelbar nach Beginn der Superfusion stiegen sowohl Kalziumtransient als auch Zellverkürzung an und stabilisierten sich dort nach zirka 40 Sekunden. Erste signifikante Effekte wurden bei einer Konzentration von  $10^{-9}$  M beobachtet, der gemessene Maximaleffekt erreichte bei  $10^{-7}$  M Isoprenalin  $252 \pm 11$  % des basalen Kalziumtransienten und  $169 \pm 10$  % der basalen Zellverkürzung. In Abbildung 9 sind die Effekte verschiedener Isoprenalinkonzentrationen, in Tabelle 4 die gemessenen Zahlenwerte dargestellt.

Tabelle 4: Wirkung von Isoprenalin auf Kalziumtransient und Zellverkürzung ( $p < 0.05$ )

Konzentration von Isoprenalin	Veränderungen relativ zum Untersuchungsbeginn	
	Kalziumtransient	Zellverkürzung
$10^{-9}$ M	$115,0 \pm 2,5$ % (n=6)	$127,3 \pm 4,1$ % (n=6)
$10^{-8}$ M	$181,1 \pm 13,8$ % (n=7)	$153,7 \pm 6,4$ % (n=6)
$10^{-7}$ M	$252,2 \pm 10,6$ % (n=6)	$168,9 \pm 10,2$ % (n=7)



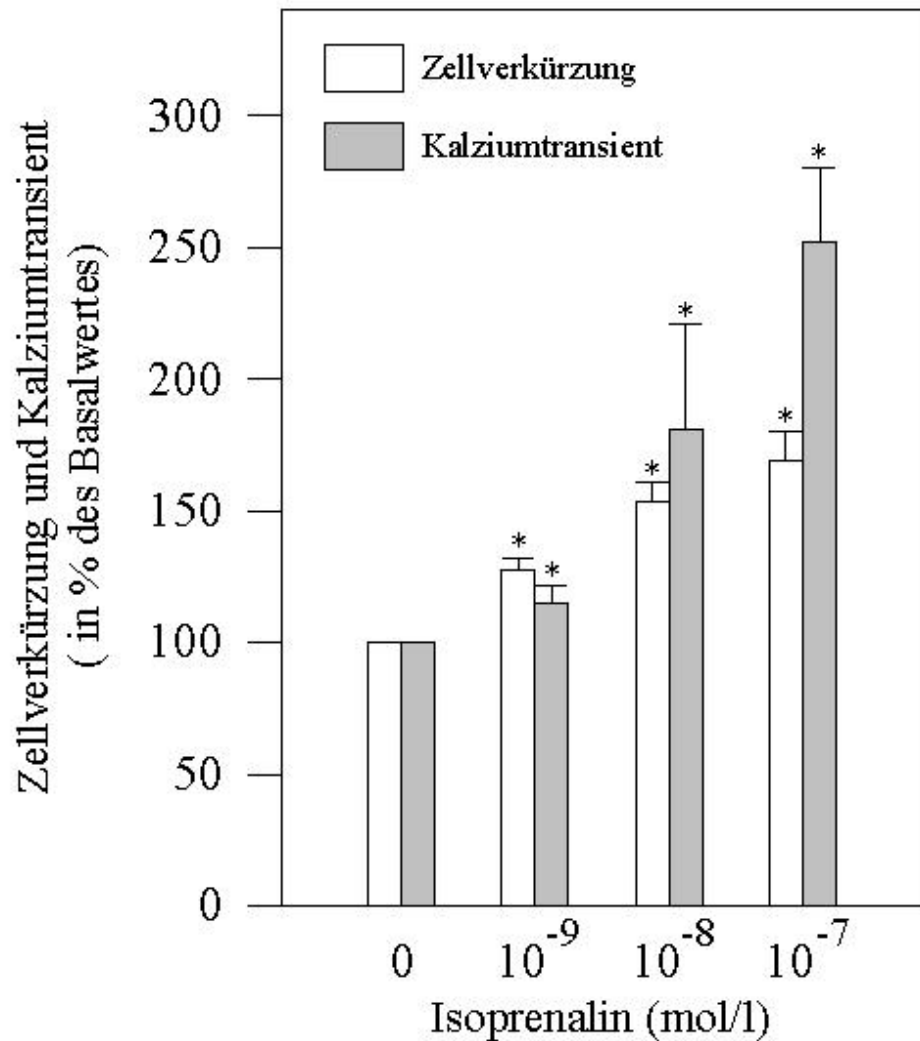


Abbildung 9: Wirkung von Isoprenalin auf Kalziumtransient und Zellverkürzung isolierter Kardiomyozyten  
(\*:  $p < 0.05$  versus Basalwert)

Hier zeigt sich, dass die relative Beeinflussung des Kalziumtransienten fast immer größer ist als die der Zellverkürzung. Das konnte auch bei anderen Messreihen beobachtet werden.

### Wirkung von Verapamil auf Kalziumtransient und Zellverkürzung

Verapamil ist ein herzwirksamer Kalziumkanalblocker. Er wirkt von extrazellulär an den Kalziumkanälen und verhindert deren Öffnung. Der systolische Kalziumeinstrom wird also verringert. Da diese Ionen die Freisetzung von Kalzium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum triggern, wird hier zusätzlich ein intrazellulärer Effekt erzielt. Das führt zu negativer Inotropie, Chronotropie und Dromotropie.

Auch der Verapamileffekt setzte sofort ein und erreichte nach zirka 20 Sekunden ein stabiles Niveau. Zur Anwendung kamen Verapamilkonzentrationen von 1, 2, 4 und 6  $\mu\text{M}$ . Signifikante Effekte wurden ab 1  $\mu\text{M}$  Verapamil gemessen, bei 4  $\mu\text{M}$  war ein Effekt von  $36 \pm 4 \%$  des basalen Kalziumtransienten und  $51 \pm 2 \%$  der basalen Zellverkürzung erreicht. Der Einsatz von 6  $\mu\text{M}$  Verapamil bewirkte eine vollständige Hemmung der Kontraktion. Auch bei dieser Messreihe – in Abbildung 10 dargestellt – sieht man deutlich, dass der Kalziumtransient relativ mehr von dem Effekt betroffen ist als die Zellverkürzung. In Tabelle 5 sind die Wirkungen von Verapamil in Zahlenwerten aufgelistet.

Tabelle 5: Wirkung von Verapamil auf Kalziumtransient und Zellverkürzung ( $p < 0.05$ )

Konzentration von Verapamil	Veränderungen relativ zum Untersuchungsbeginn	
	Kalziumtransient	Zellverkürzung
1 $\mu\text{M}$	$72,9 \pm 2,2 \%$ (n=7)	$78,2 \pm 1,5 \%$ (n=6)
2 $\mu\text{M}$	$47,5 \pm 2,1 \%$ (n=8)	$65,4 \pm 4,6 \%$ (n=8)
4 $\mu\text{M}$	$35,5 \pm 4,1 \%$ (n=8)	$51,0 \pm 2,4 \%$ (n=8)
6 $\mu\text{M}$	0 % (n=7)	0 % (n=7)

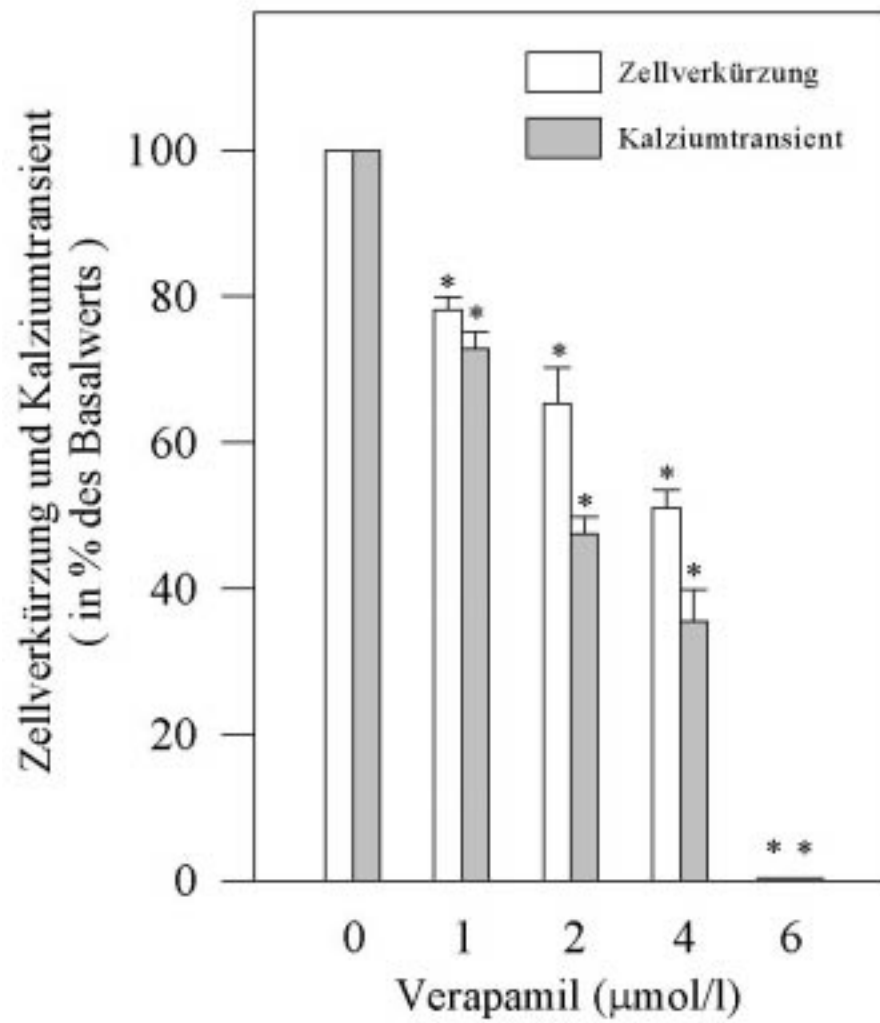


Abbildung 10: Wirkung von Verapamil auf Kalziumtransient und Zellverkürzung isolierter Kardiomyozyten  
(\*:  $p < 0.05$  versus Basalwert)

### **3.2 Effekt von PAF auf Kalziumtransient und Zellverkürzung**

Aus der Literatur ist bekannt, dass PAF seine Wirkung an den Kardiomyozyten sehr langsam entfaltet (Massey et al., 1991; Delbridge et al., 1993). In Vorversuchen wurde ermittelt, dass PAF sein Wirkungsmaximum nach 6 - 8 Minuten erreicht hat.

#### **Effekt von PAF auf die Einzelzelle**

Bei den Messungen der Wirkung von PAF auf die isolierte Herzmuskelzelle wurden minütlich die  $[Ca^{2+}]_i$  und zweiminütlich die Zellverkürzung bestimmt. Die Wirkung von PAF erreichte nach 6 - 8 Minuten ein stabiles Niveau. In Abbildung 11 ist der zeitabhängige Effekt von  $10^{-8}$  M PAF auf eine untersuchte Einzelzelle dargestellt.

Ein Auswaschen des Effektes von PAF durch anhaltende Superfusion mit Versuchspuffer gelang nicht.

#### **Systematische Messung des Effekts von PAF**

In Vorversuchen wurde der Konzentrationsbereich ermittelt, in dem PAF eine messbare Wirkung auf die isoliert kontrahierende Einzelzelle hat. Im Ergebnis wurden PAF-Konzentrationen von  $10^{-12}$  M,  $10^{-10}$  M und  $10^{-8}$  M eingesetzt. Höhere Konzentrationen führten bei den Zellen zu Hyperkontraktion oder inhibierten die Erregung, niedrigere Konzentrationen zeigten keine Wirkung. Ab einer Konzentration von  $10^{-12}$  M PAF wurden signifikante Wirkungen beobachtet, die bei  $10^{-8}$  M PAF ihr Maximum erreichten. Der dort beobachtete Maximaleffekt nach 8 Minuten betrug  $48 \pm 6$  % des basalen Kalziumtransienten und  $50 \pm 1$  % der basalen Zellverkürzung. In Abbildung 12 ist der Effekt verschiedener PAF-Konzentrationen auf den Kalziumtransienten, in Abbildung 13 auf die Zellverkürzung, dargestellt. Insgesamt wurde eine konzentrationsabhängige negativ inotrope Wirkung beobachtet. Dahingegen sanken in den 8 Minuten der Messung die basale Werte des Kalziumtransienten auf  $97 \pm 3$  % und der Zellverkürzung auf  $97 \pm 2$  %. In Tabelle 6 sind die Werte der nach 8 Minuten erreichten Veränderungen aufgelistet.

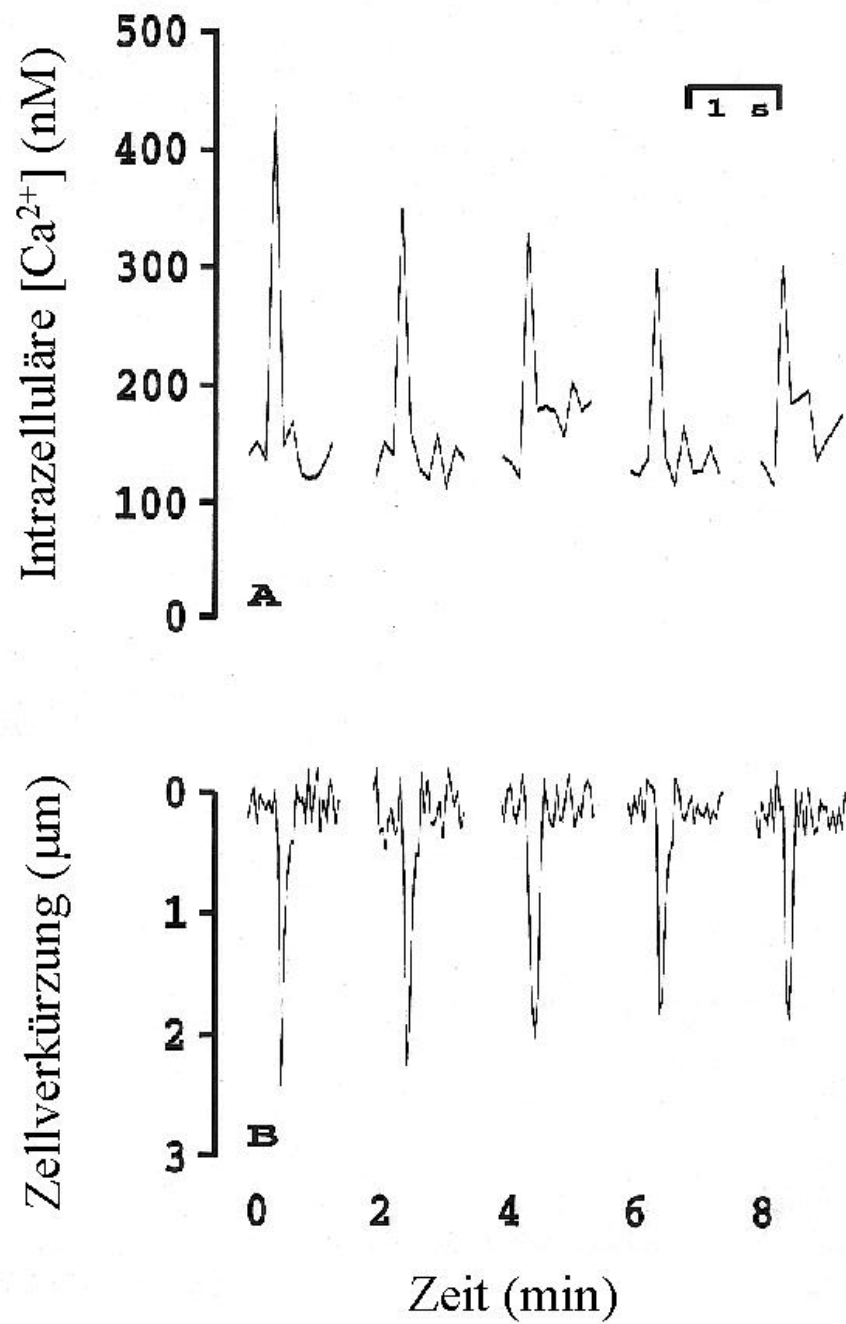


Abbildung 11: Zeitwirkungsverlauf von PAF  $10^{-8}$  M auf Kalziumtransient (A) und Zellverkürzung (B) an der Einzelzelle

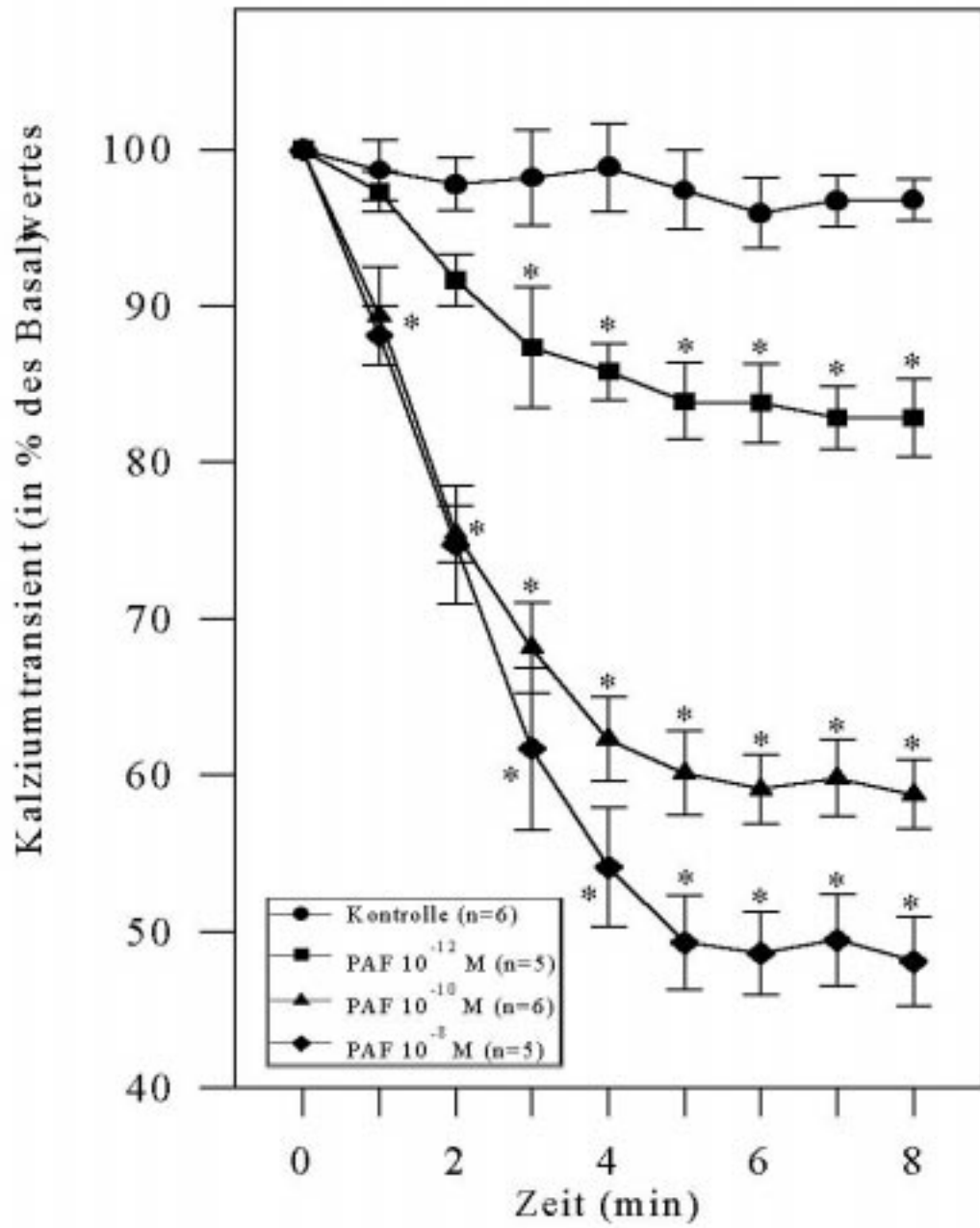


Abbildung 12: Zeitwirkungsverlauf von PAF auf den Kalziumtransienten  
(\*:  $p < 0.05$  versus Kontrollkurve)

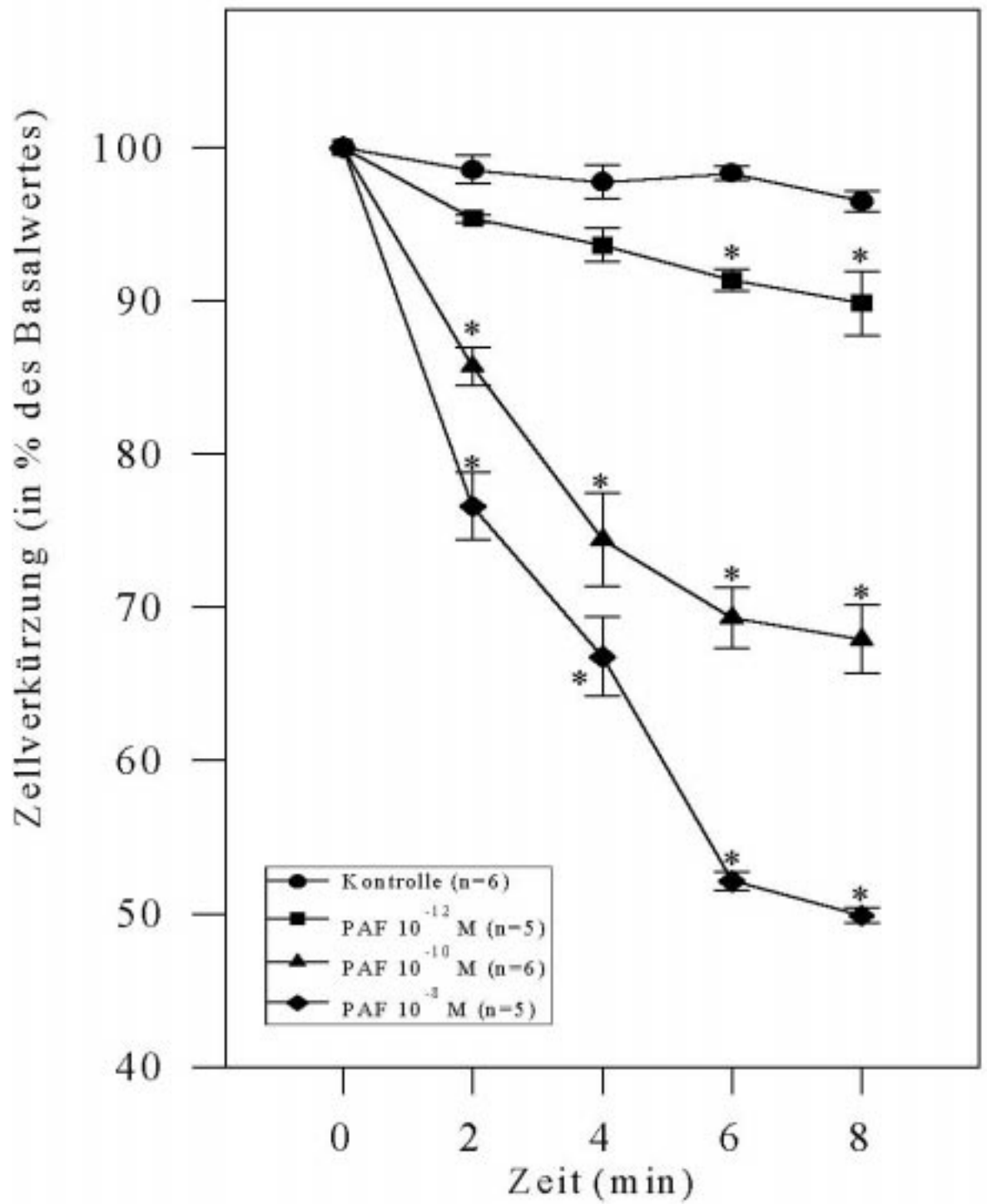


Abbildung 13: Zeitwirkungsverlauf von PAF auf die Zellverkürzung  
(\*: p<0.05 versus Kontrollkurve)

Tabelle 6: Zeitwirkungsverlauf von PAF auf Kalziumtransient und Zellverkürzung ( $p < 0.05$  versus Basalwerte)

Konzentration von PAF	Maximaleffekt nach 8 Minuten relativ zum Untersuchungsbeginn	
	Kalziumtransient	Zellverkürzung
0 (Basalwert)	$96,8 \pm 1,3 \%$ (n=6)	$96,5 \pm 0,7 \%$ (n=6)
$10^{-12}$ M	$82,9 \pm 2,5 \%$ (n=5)	$89,8 \pm 2,1 \%$ (n=5)
$10^{-10}$ M	$58,8 \pm 2,2 \%$ (n=6)	$67,9 \pm 2,3 \%$ (n=6)
$10^{-8}$ M	$48,1 \pm 2,8 \%$ (n=5)	$49,9 \pm 0,5 \%$ (n=5)

### 3.3 Antagonisierung der PAF-Wirkung durch WEB2170

Ziel weiterer Messungen war es festzustellen, ob durch den Einsatz spezifischer PAF-Rezeptorantagonisten eine Inhibition der PAF-Wirkung möglich ist. Der eingesetzte PAF-Rezeptorantagonist war WEB2170. Durch Vorversuche wurde ermittelt, dass an der isolierten Zelle eine Konzentration von  $10^{-7}$  M WEB2170 allein geringe Eigenwirkungen zeigt. Diese bestanden in einem leicht negativen Einfluss auf die Entwicklung des Kalziumtransienten ( $90 \pm 5 \%$ ) und einem deutlich positiven Einfluss auf die Zellverkürzung ( $113 \pm 5 \%$ ). Im Versuchsablauf wurde 30 Sekunden nach Beginn der Superfusion mit WEB2170 die Superfusion mit PAF gestartet. Der Einsatz von  $10^{-7}$  M WEB2170 konnte die PAF-Wirkung nicht vollständig antagonisieren. Es konnte gezeigt werden, dass es zu einer 65 %igen Reduktion der PAF-Wirkung kommt.

In Abbildung 14 sind die Einflüsse von  $10^{-10}$  M PAF allein,  $10^{-7}$  M WEB2170 allein und die der kombinierten Superfusion auf den Kalziumtransienten dargestellt. Zum Vergleich ist die Kontrollkurve mit abgebildet. Dieselbe Kurvenkombination ist in Abbildung 15 für die Einflüsse auf die Zellverkürzung gewählt. In Tabelle 7 sind die nach 8 Minuten erreichten Werte dargestellt.



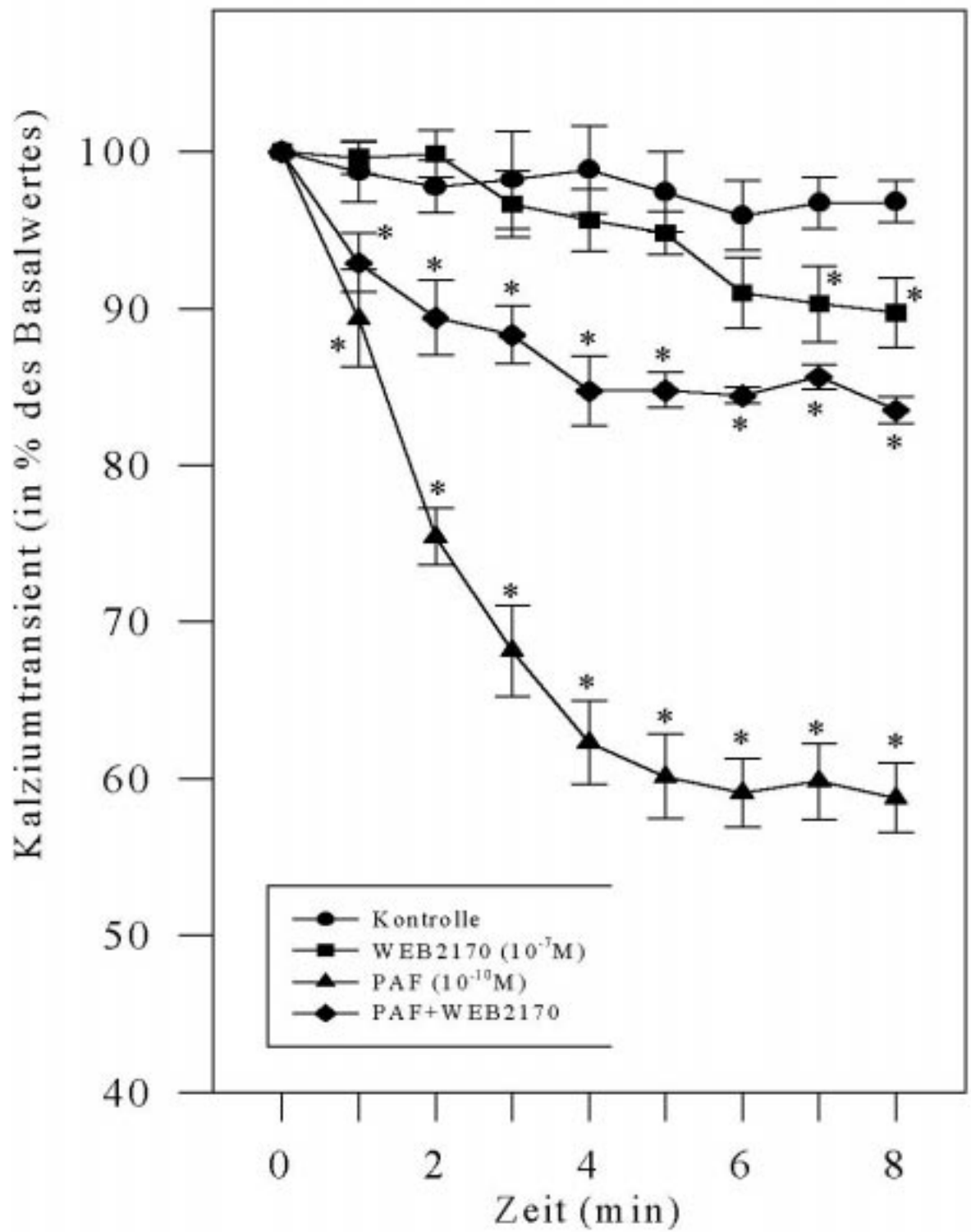


Abbildung 14: Zeitwirkungsverlauf von PAF, WEB2170 und PAF+WEB auf Kalziumtransienten (n=6, \*:  $p < 0.05$  versus Kontrollkurve)

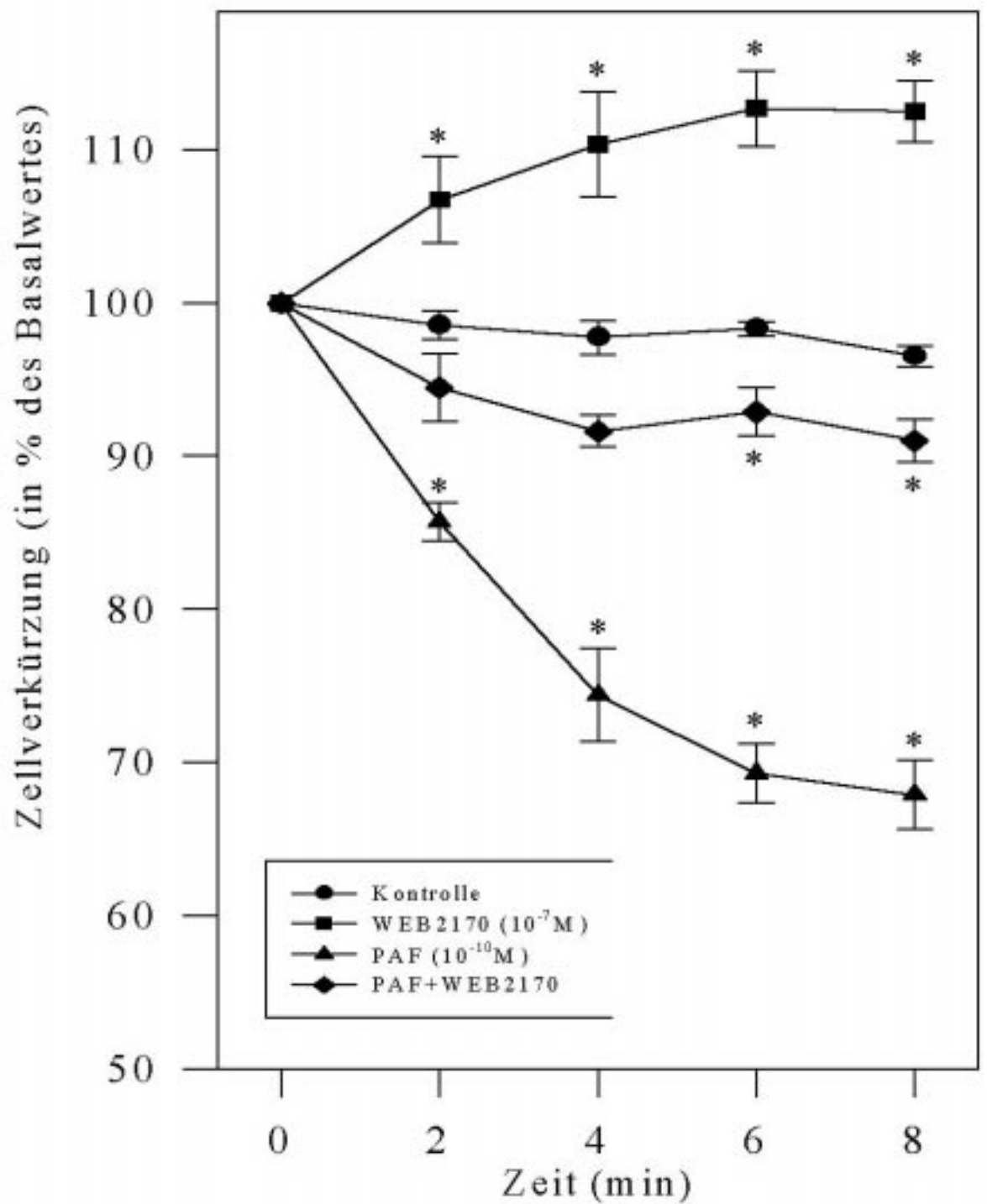


Abbildung 15: Zeitwirkungsverlauf von PAF, WEB2170 und PAF+WEB auf die Zellverkürzung (n=6, \*:  $p < 0.05$  versus Kontrollkurve)

Tabelle 7: Wirkung von  $10^{-10}$  M PAF,  $10^{-7}$  M WEB2170 und PAF+WEB2170 auf Kalziumtransient und Zellverkürzung (p<0.05 versus Basalwerte, <sup>+</sup>: p<0.05 versus  $10^{-10}$  M PAF)

Wirkstoff	Maximaleffekt nach 8 Minuten	
	relativ zum Untersuchungsbeginn	
	Kalziumtransient	Zellverkürzung
0 (Basalwert)	96,8 ± 1,3 % (n=6)	96,5 ± 0,7 % (n=6)
$10^{-10}$ M PAF	58,8 ± 2,2 % (n=6)	67,9 ± 2,3 % (n=6)
$10^{-7}$ M WEB2170	89,7 ± 2,2 % (n=6)	112,5 ± 2,0 % (n=6)
PAF+WEB2170	83,5 ± 0,9 % (n=6) <sup>+</sup>	91,0 ± 1,4 % (n=6) <sup>+</sup>

## **4 Diskussion**

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Messsystem zur simultanen Bestimmung von Kontraktion und intrazellulärer Kalziumkonzentration isolierter Kardiomyozyten entwickelt. Nach Untersuchungen zur Funktion und Stabilität des Messsystems wurde erstmals gezeigt, dass PAF konzentrationsabhängig die systolische intrazelluläre Kalziumkonzentration senkt. Durch den Einsatz eines diese Wirkung hemmenden spezifischen PAF-Rezeptorantagonisten wurde nachgewiesen, dass es an der Herzmuskelzelle spezifische PAF-Rezeptoren geben muss.

Die Isolation von Herzmuskelzellen verschiedener Säugetierspezies ist schon seit längerem etabliert (Capogrossi et al., 1986; Down et al., 1981; Jacobson et al., 1989). Die aus der Erfahrung entstandenen Routinen führen dazu, dass heute Richtwerten zur Verfügung stehen, welche auch in der vorliegenden Arbeit einen Vergleich der Resultate zur Zellfunktion mit anderen, internationalen Arbeitsgruppen zulassen.

Natürlich ist bei einem so sensiblen biologischen System wie der isoliert kontrahierenden Herzmuskelzelle kein absoluter Vergleich möglich, weil eine große Anzahl von Faktoren außerhalb der Isolation auf die Zellen einwirkt und eine nach der Isolation intakte Zelle durch das Beladen mit Farbstoff, die lang anhaltende Stimulation oder die Anregung mit dem Laser in Mitleidenschaft gezogen werden kann. Vergleichsdaten gibt es zur Zellausbeute, Zellgröße und -morphologie, zur Größe von Kalziumtransienten und Kontraktionsvermögen sowie zu den Einflüssen verschiedener Standardsubstanzen wie Verapamil und Isoprenalin. Diese Referenzen erlauben es, die entwickelte Methode einzuschätzen und Schlüsse auf den Zustand der isolierten Zellen zu ziehen.

### **4.1 Zellausbeute**

Seit Anfang der 60iger Jahre wurden Versuche unternommen, Herzmuskelzellen zu isolieren. Die erste Methode war die mechanische Disruption (Muir et al., 1965).

Der bessere und bis heute verwendete Ansatz besteht in der enzymatischen Auflösung der Zellverbände (Kono, 1969; Berry et al., 1970). Hier bestehen mehrere Möglichkeiten. Die Auflösung von Gewebeoberflächen durch direkten Kontakt mit den Enzymen führt zwar zur Darstellung von Einzelzellen, die Zellausbeute sowie die Rate funktionsfähiger Zellen sind aber gering. Die enzymatische Perfusion von Gewebe durch die bestehenden Gefäße hingegen ist ein Verfahren, bei dem die Kontrolle vieler Parameter möglich ist. Enzymeinwirkzeit und Perfusionsdruck können exakt festgelegt werden. So ist es möglich, den Stress für die Zellen zu minimieren.

In der Literatur gibt es Angaben über eingesetzte Enzymkonzentrationen. Da kommerzielle Enzyme aber in sehr unterschiedlichen Reinheitsgraden und Aktivitäten erhältlich sind, sind Konzentrationsangaben in mg/ml, wie es in den meisten Arbeiten vorkommt, nicht vergleichbar (Vahouny et al., 1970; Berry et al., 1970). Howard et al. (1994) perfundierten mit einer Enzymkombination über 45 Minuten, Horackova & Mapplebeck (1989) nur über 25 Minuten. In den Experimenten zur vorliegenden Arbeit führten wir eine retrograde Perfusion mit Enzymlösung über eine verhältnismäßig lange Zeit von 50 Minuten durch, es wurde aber eine sehr geringe Enzymkonzentration eingesetzt (50 U/ml). Dies beruht auf der Vorstellung, dass eine niedrige Konzentration eines spezifisch auf die interzellulären Verbindungen gerichteten Enzyms auch auf längere Zeit geringere Nebenwirkungen an der Zelloberfläche und auf die Zellfunktion hat.

Die in der Literatur erhältlichen Zahlen zur Zellausbeute differieren sehr stark. Yu et al., 1994, fanden im Durchschnitt 26 Millionen Zellen pro Rattenherz, wohingegen in anderen Arbeiten von 2 - 7,5 Millionen Zellen die Rede ist (Howard et al., 1994; Hori et al., 1996). In der Promotionsarbeit von Dendorfer (1990) wurden  $2 \times 10^7$  Kardiomyozyten pro 1 g Ventrikelgewebe gefunden. All diese Angaben gelten für die Herzen erwachsener Ratten. Die Zahlen dieser Arbeit liegen mit  $4,9 \pm 0,3$  Millionen Zellen also durchaus im in der Literatur erwähnten Bereich.

Aus der Literatur sind leider keine Angaben darüber zu gewinnen, wie stark sich die Zahl der morphologisch intakten Zellen in der Zeit nach der Isolation noch ändert. Das sogenannte Kalzium-Paradoxon bezeichnet die Hyperkontraktion von kalziumintoleranten Herzmuskelzellen, wenn sie nach der kalziumfreien Isolation wieder mit extrazellulären Kalziumionen in Kontakt kommen (Zimmerman et al., 1966; Crevey et al., 1978). Die in dieser Arbeit relativ niedrige Quote an kalziumintoleranten Zellen weist auf eine gute Zellfunktion nach der Isolation hin.

## **4.2 Basale Homöostase**

Über die Erregung der Zellen gibt es in der Literatur relative Einstimmigkeit: Man stimuliert die Zellen mit Rechteckimpulsen von 1 - 5 ms Länge bei einer Intensität von 30 - 80 V und einer Frequenz von 0,5 - 2 Hz (Williams et al., 1992; Cheng et al., 1994; Cannell et al., 1994). Wie lange die Zellen unter diesen Bedingungen erregbar sind, wird nicht erwähnt, allerdings sind Protokolle bis 40 Minuten beschrieben. Diesen Vorgaben passt sich die vorliegende Arbeit gut an.

Eine neue Entwicklung intrazellulärer Kalziumfarbstoffe ist FLUO-3. Diese Substanz hat einem entscheidenden Vorteil – die in bestimmten Bereichen ausgesandte Fluoreszenz ist proportional der wirklichen Kalziumkonzentration, die Anregung erfolgt gerastert mit dem Laser und erzeugt keine Eigenfluoreszenz des Farbstoffs. Dadurch vereinfacht sich die Berechnung der intrazellulären Kalziumkonzentration nach der in Kapitel 2.5 genannten Formel (Minta et al., 1989).

Tabelle 8: Basale Parameter isolierter Kardiomyozyten.  
ausgewählte Literaturstellen im Vergleich

Autor	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>ext.</sub> (mM)	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>diast.</sub> (nM)	[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>syst.</sub> (nM)	Zelllänge (µm)	Zellver- kürzung (%)
Spurgeon et al., 1992	1-2	125	200	100	8,5
Failli et al., 1992	1	117			
	2	159			
	3,6	174			
Cheng et al., 1994	1	100	bis 1820		
Williams et al., 1992				41-105	3
Cannell et al., 1994	1	100	1150	65	8,6
Church et al., 1994		149	252		
Geerts et al., 1989		152	500-800		
Suetake et al., 1992	1,5		560		11
	0,5		250		4,5
Spurgeon et al., 1990	1			130	10
Yu et al., 1994	1,8	80	370		
Tamura et al., 1992	2			145	6
Diese Arbeit	1,2	123	524	112	5,2

Für die Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes gibt es verschiedene Angaben, so verwenden manche Autoren 1,4 µM FLUO-3 (Suetake et al., 1992), andere 5 µM FLUO-3 (Cannell et al., 1994) und andere wiederum 25 µM FLUO-3 (Williams et al., 1992). Die in dieser Arbeit verwendeten 3 µM des Fluoreszenzfarbstoffes wurden deshalb so niedrig gewählt, weil

einerseits bei der Inkubation der Zellen mit dem in DMSO gelösten FLUO-3 allein schon das Lösungsmittel eine große Belastung der Zellen darstellt, andererseits der Farbstoff in höheren Konzentrationen toxisch wirkt.

Im weiteren Protokoll wurden in der vorliegenden Arbeit nun rhythmisch und konstant kontrahierende Zellen ausgewählt. In Tabelle 8 sind Werte aus der Fachliteratur den in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnissen gegenübergestellt.

### **4.3     Modulierbarkeit des Messsystems**

Um die Modulierbarkeit des Systems zu überprüfen, wurden Testsubstanzen mit bekannten Wirkungen eingesetzt.

Die Wirkung von Isoprenalin wird durch den  $\beta_1$ -Rezeptor vermittelt, der sich unter anderem auf der Oberfläche des Kardiomyozyten befindet. Es lag also nahe, die Wirkungsvermittlung dieses Rezeptors zu untersuchen, um eine Aussage über den Zustand der Zelloberfläche nach der enzymatischen Isolation zu machen. In Tabelle 9 sind die Literaturstellen aufgeführt, in denen eine ähnliche Untersuchung erfolgte. Die Zahlen zeigen durchaus vergleichbare Wirkungen von Isoprenalin im Bereich von 1 nM bis 1000 nM.

Deutlich wird, dass in der vorliegenden Arbeit keine großen Abweichungen von den bekannten Wirkungen festgestellt wurden. Fraglich ist, ob die in den Arbeiten von Bell & McDermott (1994) und Yu et al. (1994) aufgeführten Werte eine Konzentrations-Wirkungsbeziehung widerspiegeln oder Einzelmessungen darstellen.

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit zeigen deutlich einen konzentrationsabhängigen positiv inotropen Effekt von Isoprenalin. Der Effekt wurde mit in anderen Arbeiten üblichen Konzentrationen erzielt und erreichte ähnliche Dimensionen.

Tabelle 9: Wirkung von Isoprenalin auf Kalziumtransient und Zellverkürzung, ausgewählte Literaturstellen im Vergleich

<b>Autor</b>	<b>Isoprenalin-Konzentration</b>	<b>Kalziumtransient</b> (versus Basalwert)	<b>Kontraktion</b> (versus Basalwert)
Pieper et al., 1989	1 nM		137%
	10 nM		181%
	100 nM		210%
	1000 nM		212%
Bell&McDermott, 1994	100 nM		123%
Tamura et al., 1992	10 nM	161%	237%
	100 nM	223%	285%
Yu et al., 1994	1 nM	207%	
Diese Arbeit	1 nM	115%	127%
	10 nM	181%	153%
	100 nM	252%	169%

Verapamil wirkt direkt an den Kalziumkanälen der Herzmuskelzelle. Auch hier bedeutet eine reproduzierbare Wirkungsvermittlung, dass nach der Isolation eine intakte Zelloberfläche vorhanden sein muss. In Tabelle 10 sind die wenigen Literaturstellen aufgeführt, in denen eine ähnliche Untersuchung erfolgte. Die Zahlen zeigen für den Kalziumtransienten, dass hier durch gleiche Verapamilkonzentrationen ähnliche Wirkungen erzielt wurden.

Auch hier zeigt sich eine vergleichbare Wirkung bei ähnlichen Konzentrationen. Bisher gibt es keine veröffentlichte Arbeit, in der eine Konzentrations-Wirkungsbeziehung von Verapamil am isolierten Kardiomyozyten dargestellt wird.



Tabelle 10: Wirkung von Verapamil auf Kalziumtransient und Zellverkürzung, ausgewählte Literaturstellen im Vergleich

<b>Autor</b>	<b>Verapamil-Konzentration</b>	<b>Kalziumtransient (versus Basalwert)</b>	<b>Kontraktion (versus Basalwert)</b>
Wang et al., 1997	10 µM	47 %	
Santi et al., 1995	10 µM	33 %	
Diese Arbeit	1 µM	73 %	78 %
	2 µM	48 %	65 %
	4 µM	36 %	51 %
	6 µM	0 %	0 %

#### 4.4 PAF-Wirkungen an isolierten Kardiomyozyten

PAF ist ein hochpotenter Vasokonstriktor, der sowohl über eigene Rezeptoren als auch über die Induktion der Produktion vasoaktiver Substanzen seine Wirkung entfaltet. Dies geschieht natürlich vorrangig im Gefäßbett selbst, es kommt aber auch auf Organebene zur Wirkungen, die sich nicht allein durch die Gefäßeffekte erklären lassen. Da PAF ein bedeutendes Bindeglied in der Kette Ischämie-Schock-Reperfusionsschaden ist, hat die Forschung zur Unterbrechung dieser Wirkungsbeziehung durch PAF-Rezeptorantagonisten eine besondere Bedeutung. Die vom Schock besonders betroffenen Organe Herz, Lunge, Niere und Gehirn werden hier gesondert untersucht.

Die Effekte von PAF am Herzen sind, wie schon eingangs beschrieben, abhängig von der betrachteten Einheit. Das Herz als Gesamtheit hat mehrere auf PAF vermutlich unterschiedlich reagierende Gewebe, wobei die separaten Effekte nicht ohne weiteres zu differenzieren sind.

Versuche am ganzen Herzen wurden vielfach durchgeführt. Die dabei beschriebenen Wirkungen reichen von positiv inotropen (Kamitani et al., 1984; Nakaya & Tohse, 1986), negativ inotropen (Levi et al., 1984; Felix et al., 1990), biphasischen (Camussi et al., 1984; Alloatti et al., 1986; Diez et al., 1990) bis zu keinen (Kamitani et al., 1984) Effekten. Das macht deutlich, dass exakte Werte nicht nur von der Art der Präparation und dem Arbeitsumfeld der Arbeitsgruppen abhängen, sondern dass auch mit so spezifischen Methoden wie der Langendorff-Perfusion an biologischen Objekten durchaus widersprüchliche Daten gewonnen werden können.

Erste spezifischere Ergebnisse erlangten Robertson et al. (1987) durch die Verwendung von humanen Herzmuskelstreifen aus dem Herzohr von Bypass-Operierten. Hier war – nicht zuletzt durch das andere Versuchsobjekt – eine Gefäßperfusion nicht möglich, so dass von außen auf die Muskelstreifen

Tabelle 11: PAF-Effekt auf die Kontraktilität humaner Herzmuskelstreifen aus dem Herzohr (aus: Robertson et al., 1987)

PAF-Konzentration	Kontraktilität (versus Kontrolle)
$10^{-10}$ M	94 %
$10^{-9}$ M	82%
$10^{-8}$ M	66 %
$10^{-7}$ M	58 %
$10^{-6}$ M	57 %
Lyso-PAF $10^{-5}$ M	98 %

einwirkende PAF-Konzentrationen nur anhand der Kontraktionen in ihrer Wirkung vermessen werden konnten. Robertson et al. zeigten 1987 erstmals einen eindeutig negativ inotropen Effekt durch PAF. Dieser Effekt war reproduzierbar, konzentrationsabhängig und durch Lyso-PAF nicht auslösbar. In Tabelle 11 sind diese Messungen wiedergegeben. In Robertsons Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass der Einsatz spezifischer PAF-Rezeptorantagonisten den PAF-Effekt verhindert, dass der Einsatz von Prostaglandin- und Leukotriensynthesehemmern aber keine Wirkung zeigt. Dies lässt sich durch eine direkte Wirkung von PAF auf das Myokard erklären.

Das einzige Problem an dieser Studie ist die Unreinheit des betrachteten Objekts – denn auch wenn am Herzmuskelstreifen eine genauere Ortung von Effekten möglich ist, so ist immer noch ein Gemisch von Zellen im Experiment vorhanden.

Massey et al. untersuchten 1991 den Effekt von PAF auf adulte Kardiomyozyten der Ratte sowie auf neonatale Rattenherz-Zellkulturen. Letztere wurden einerseits elektrisch stimuliert, andererseits bei spontaner Kontraktion untersucht. Bei den spontan kontrahierenden Zellkulturen wurde bei der Einwirkung von PAF eine Frequenzerhöhung beobachtet.

Massey et al. fanden eine konzentrationsabhängige negative Wirkung von PAF auf die Kontraktilität der untersuchten Kardiomyozyten. Auch hier zeigte Lyso-PAF keine Wirkung. Mit dieser Methode wurden die Daten 3 Minuten nach Beginn der PAF-Superfusion erhoben. In Tabelle 12 sind diese Ergebnisse dargestellt.

Tabelle 12: Effekt von PAF auf die Kontraktilität isolierter adulter und neonataler Kardiomyozyten der Ratte  
(aus: Massey et al., 1991)

<b>Zellart</b>	<b>PAF-Konzentration</b>	<b>Kontraktilität nach 3 Minuten (versus Basalwerte)</b>
adulte Kardiomyozyten	$2 \times 10^{-7}$ M	78 %
neonatale Kardiomyozyten, spontan kontrahierende Zellkultur	$1 \times 10^{-9}$ M	85 %
	$8 \times 10^{-9}$ M	81 %
	$2 \times 10^{-8}$ M	86 %
	$8 \times 10^{-8}$ M	61 %
	$2 \times 10^{-7}$ M	35 %
	Lyso-PAF $1 \times 10^{-7}$ M	kein Effekt
neonatale Kardiomyozyten, elektrisch stimulierte Zellkultur	$2 \times 10^{-8}$ M	76 %
	$8 \times 10^{-8}$ M	68 %

Diese Daten gaben erste Anhaltspunkte für die Größenordnung, in der bei den durchzuführenden Versuchen Ergebnisse zu erwarten waren. Die eingesetzten PAF-Konzentrationen waren erheblich höher – das könnte einerseits an der höheren Temperatur (36 °C in Masseys Arbeit) des Messsystems liegen, andererseits sind dedifferenzierte neonatale Zellen mit einer anderen Rezeptorpopulation besetzt als adulte, frisch isolierte Herzmuskelzellen. Die spontan kontrahierenden, kultivierten Herzmuskelzellen in Masseys Arbeit sind allerdings ein völlig anderes Modell. Strukturelle, metabolische und funktionelle Unterschiede zwischen kultivierten neonatalen Kardiomyozyten und intaktem Gewebe wurden nachgewiesen (Pollack et al., 1991; Woodcock et al., 1992). Ein Vergleich von kultivierten mit frisch isolierten Zellen ist darum nicht ohne weiteres möglich.

Unterschiede zwischen kultivierten neonatalen Kardiomyozyten und intaktem Gewebe wurden nachgewiesen (Pollack et al., 1991; Woodcock et al., 1992). Ein Vergleich von kultivierten mit frisch isolierten Zellen ist darum nicht ohne weiteres möglich.

Eine weitere Arbeit zu diesem Thema stammt von Delbridge et al., 1993. Hier wurde der Einfluss von PAF auf die Kontraktilität frisch isolierter Kardiomyozyten der Ratte untersucht. Die Isolation war ähnlich der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen, das Messprotokoll zeigte als einzige Abweichung eine Arbeitstemperatur von 36 °C. Auch hier fand sich ein konzentrationsabhängig negativ inotroper Effekt. Die PAF-Wirkung konnte durch den spezifischen PAF-Rezeptorantagonisten WEB2086 verringert werden. In Tabelle 13 sind die von Delbridge et al. nach 9 Minuten gemessenen Effekte dargestellt.

Tabelle 13: Effekt von PAF und WEB2086 auf die Kontraktilität frisch isolierter Kardiomyozyten der Ratte. Maximalwerte nach 6 Minuten.  
(aus: Delbridge et al., 1993)

Wirkstoffkonzentration	Kontraktilität (versus Kontrolle)
0	96 %
PAF $10^{-11}$ M	89 %
PAF $10^{-9}$ M	90 %
PAF $10^{-7}$ M	77 %
PAF $10^{-7}$ M + WEB 2086 $10^{-5}$ M	89 %
WEB 2086 $10^{-5}$ M	116 %

In der Arbeit von Delbridge et al. wird deutlich, dass man den negativ inotropen Effekt von PAF durch den Einsatz von WEB2086 verringern kann. Die beschriebenen höheren Wirkstoffkonzentrationen sind sicher auf das andere Versuchsdesign zurückzuführen, auch ist in der Arbeit nicht angegeben, welche Art PAF verwendet wurde.

Eine Frage bleibt aber auch nach dieser Arbeit: Wie wirkt PAF an der Herzmuskelzelle? Die starke Hemmung der PAF-Wirkung durch den Einsatz von WEB2086 könnte einerseits durch einen spezifischen PAF-rezeptorantagonistischen Effekt hervorgerufen sein, andererseits ist auch eine

Überlagerung des negativ inotropen PAF-Effekts durch den positiv inotropen WEB2086-Effekt denkbar.

Der direkte Vergleich der vorliegenden Arbeit mit der Literatur ist bei der geringen Auswahl sehr schwierig. Bestätigt werden konnten die Ergebnisse von Delbridge et al. 1993, da das Gesamtbild auffallend übereinstimmt.

Durch den neuen Ansatz der simultanen Messung von Kalziumtransient und Zellverkürzung konnten die Wirkmechanismen sowohl von PAF als auch von WEB2170 besser dargestellt werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit beweisen, dass der negativ inotrope Effekt von PAF an der Herzmuskelzelle durch einen verringerten systolischen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration bedingt ist. Der Nachweis einer simultanen Verringerung von Kalziumtransient und Zellverkürzung unter PAF-Einwirkung ist nicht unerwartet, da mehrere internationale Arbeitsgruppen jeweils eine der beiden Messkomponenten reproduzierbar nachgewiesen haben. In der vorliegenden Arbeit aber gelang erstmals der simultane Vergleich beider Messgrößen. Des Weiteren zeigte sich, dass auch niedrige PAF-Konzentrationen, wie sie zum Beispiel im Verlauf ischämischer Ereignisse auftreten, direkt am Kardiomyozyten eine negative Inotropie bewirken.

Erstmals gelang der Nachweis, dass die positive Wirkung von WEB2170 auf die Zellkontraktion durch eine kalziomsensibilisierende Komponente bedingt ist. So stieg die Zellverkürzung zwar an, es ließ sich aber kein Anstieg der intrazellulären systolischen Kalziumkonzentration darstellen. Durch den Einsatz der simultanen Messung von Kalziumtransient und Zelllänge konnte gezeigt werden, dass WEB2170 zu der Gruppe der Kalziomsensitizer gehört.

Durch Präinkubation der Zellen mit WEB2170 konnte der PAF-Effekt deutlich reduziert werden. Somit wurde nachgewiesen, dass an der Herzmuskelzelle spezifische PAF-Rezeptoren vorhanden sein müssen. Ein reiner Überlagerungseffekt der Kontraktionsbeeinflussungen durch PAF und WEB2170 konnte ausgeschlossen werden, da bei den Messungen deutlich wurde, dass WEB2170 die negative Wirkung von PAF auf den Kalziumtransienten hemmt, ohne selbst einen positiven Effekt auf den Kalziumtransienten zu haben.

## **4.5 Ausblick**

In Anknüpfung an die Ergebnisse dieser Arbeit ergeben sich drei wesentliche Fragen: Gibt es an der Herzmuskelzelle auch intrazelluläre Rezeptoren, insbesondere am sarkoplasmatischen Retikulum? Wo sind weitere PAF-Rezeptoren lokalisiert und wie sind sie verteilt? Wirken spezifische PAF-Rezeptorantagonisten auch in der Herzmuskelzelle?

Zur Beantwortung dieser Fragen in besonderer Hinsicht auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration wären vergleichende Versuche an der Zellmembran und am sarkoplasmatischen Retikulum der Herzmuskelzelle erforderlich. Als diesbezüglich weiterführende Methode wäre die Voltage-Clamp-Technik denkbar, welche man sowohl an der Oberfläche als auch am isolierten sarkoplasmatischen Retikulum von Kardiomyozyten anwenden könnte.

Wichtig wäre es, all diese an nichthumanen Spezies erzielten Ergebnisse auch an der adulten menschlichen Herzmuskelzelle nachzuvollziehen. Würden sich die Resultate bestätigen, wäre ein weiterer Schritt zum klinischen Einsatz von PAF-Rezeptorantagonisten vollzogen.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass der bekannte negativ inotrope Effekt von plättchenaktivierendem Faktor (PAF) auf die Kontraktion isolierter adulter Kardiomyozyten der Ratte über spezifische PAF-Rezeptoren vermittelt wird und auf einer Verringerung des systolischen Kalziumeinstroms in die Zelle beruht.

Dazu wurde ein Isolationssystem zur Gewinnung adulter Kardiomyozyten der Ratte etabliert. Die erhaltenen Herzmuskelzellen wurden mit einem Fluoreszenzfarbstoff für Kalzium beladen und mittels eines elektrischen Feldes zur rhythmischen Kontraktion gebracht. Durch den Einsatz der konfokalen Laser-rastermikroskopie (CLSM) wurde es möglich, die Messwerte für Zelllänge und intrazelluläre Kalziumkonzentration simultan zu erfassen.

Um die Funktionsfähigkeit des Messsystems zu bewerten, wurden die Testsubstanzen Isoprenalin und Verapamil appliziert. Die dabei erzielten Wirkungen auf die gemessenen Parameter waren reproduzierbar und konzentrationsabhängig und mit den Angaben internationaler Arbeitsgruppen vergleichbar.

Mit den konstant kontrahierenden Kardiomyozyten wurde der sich nach zirka 6 Minuten stabilisierende negativ inotrope Effekt von PAF nachgewiesen. Diese PAF-Wirkung war ebenfalls reproduzierbar, konzentrationsabhängig und durch eine Verringerung des systolischen Kalziumeinstroms gekennzeichnet.

Um das Vorhandensein eines PAF-Rezeptors auf der Oberfläche des isolierten Kardiomyozyten nachzuweisen, wurde der spezifische PAF-Rezeptorantagonist WEB2170 appliziert. Es konnte gezeigt werden, dass sich der negativ inotrope Effekt von PAF durch den Einsatz eines Rezeptorantagonisten spezifisch hemmen lässt. Damit kann der wissenschaftliche Schluss gezogen werden, dass es an der Herzmuskelzelle der adulten Ratte spezifische PAF-Rezeptoren gibt.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Abete,P., Ferrara,N., Leosco,D., Caccese,P., Landino,P., Sederino,S., Balbi,R., and Rengo,F. (1992): Age-related effects of platelet activating factor (PAF) in the isolated perfused rat heart. *J.Mol.Cell Cardiol.*, 24:1399-1407.
2. Alloatti,G., Montrucchio,G., Mariano,F., Tetta,C., De Paulis,R., Morea,M., Emanuelli,G., and Camussi,G. (1986): Effect of platelet-activating factor (PAF) on human cardiac muscle. *Int.Arch.Allergy Appl.Immunol.*, 79:108-112.
3. Bell,D. and McDermott,B.J. (1994): Secretin and vasoactive intestinal peptide are potent stimulants of cellular contraction and accumulation of cyclic AMP in rat ventricular cardiomyocytes. *J.Cardiovasc.Pharmacol.*, 23:959-969.
4. Benveniste,J., Henson,P.M., and Cochrane,C.G. (1972): Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets. The role of IgE, basophils, and a platelet-activating factor. *J.Exp.Med.*, 136:1356-1377.
5. Benveniste,J., Egido,J., Gutierrez,M., V, and Camussi,G. (1977): Detection of immediate hypersensitivity in rabbits by direct basophil degranulation. *J.Allergy Clin.Immunol.*, 59:271-279.
6. Benveniste,J., Camussi,J., and Polonsky,J. (1977): Platelet-activating factor. *Monogr Allergy*, 12:138-142.
7. Benveniste,J., Le Couedic,J.P., Polonsky,J., and Tence,M. (1977): Structural analysis of purified platelet-activating factor by lipases. *Nature*, 269:170-171.
8. Benveniste,J. (1981): Platelet-activating factor (PAF-acether): present status. *Agents Actions*, 11:542-544.
9. Berry,M.N., Friend,D.S., and Scheuer,J. (1970): Morphology and metabolism of intact muscle cells isolated from adult rat heart. *Circ.Res.*, 26:679-687.
10. Bkaily,G., Wang,S., Bui,M., Stankova,J., and Rola,P.M. (1996): Modulation of cardiac cell  $Ca^{2+}$  currents by PAF. *Blood Press Suppl*, 3:59-62.
11. Blank,M. (1979): Surface pharmacology: drug binding equilibria and ion transport in membrane structures. *Pharmacol.Ther.*, 7:313-328.
12. Braquet,P. and Hosford,D. (1989): The potential role of platelet-activating factor (PAF) in shock, sepsis and adult respiratory distress syndrome (ARDS). *Prog.Clin.Biol.Res.*, 308:425-439.
13. Brass,L.F. (1988): G protein regulators of platelet activation. *Prog.Clin.Biol.Res.*, 283:441-492.
14. Camussi,G., Alloatti,G., Montrucchio,G., Meda,M., and Emanuelli,G. (1984): Effect of platelet activating factor on guinea-pig papillary muscle. *Experientia*, 40:697-699.
15. Cannell,M.B., Cheng,H., and Lederer,W.J. (1994): Spatial non-uniformities in  $[Ca^{2+}]_i$  during excitation-contraction coupling in cardiac myocytes. *Biophys.J.*, 67:1942-1956.
16. Capogrossi,M.C., Kort,A.A., Spurgeon,H.A., and Lakatta,E.G. (1986): Single adult rabbit and rat cardiac myocytes retain the  $Ca^{2+}$ - and species-dependent systolic and diastolic contractile properties of intact muscle. *J.Gen.Physiol*, 88:589-613.
17. Chao,W. and Olson,M.S. (1993): Platelet-activating factor: receptors and signal transduction. *Biochem.J.*, 292:617-629.
18. Cheng,H., Cannell,M.B., and Lederer,W.J. (1994): Propagation of excitation-contraction coupling into ventricular myocytes. *Pflugers Arch.*, 428:415-417.
19. Church,D.J., van,d.B., V, Vallotton,M.B., Capponi,A.M., and Lang,U. (1994): Calcium influx



in platelet activating factor-induced atrial natriuretic peptide release in rat cardiomyocytes. *Am.J.Physiol*, 266:E403-E409

20. Crevey,B.J., Langer,G.A., and Frank,J.S. (1978): Role of  $Ca^{2+}$  in maintenance of rabbit myocardial cell membrane structural and functional integrity. *J.Mol.Cell Cardiol.*, 10:1081-1100.
21. Delbridge,L.M., Stewart,A.G., Goulter,C.M., Morgan,T.O., and Harris,P.J. (1994): Platelet-activating factor and WEB-2086 directly modulate rat cardiomyocyte contractility. *J.Mol.Cell Cardiol.*, 26:185-193.
22. Demopoulos,C.A., Pinckard,R.N., and Hanahan,D.J. (1979): Platelet-activating factor. Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators). *J.Biol.Chem.*, 254:9355-9358.
23. Dendorfer, A. Kompartimentierung des myokardialen Purinstoffwechsels: Studien an isolierten Kardiomyozyten und Mikrogefäßen des Meerschweinchenherzens. Dissertationsschrift zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München . 12-7-1990.
24. Diez,J., Delpon,E., and Tamargo,J. (1990): Effects of platelet activating factor on contractile force and  $^{45}Ca$  fluxes in guinea-pig isolated atria. *Br.J.Pharmacol.*, 100:305-311.
25. Down,W.H., Chasseaud,L.F., and Sacharin,R.M. (1981): Factors affecting induction of lung aryl hydrocarbon hydroxylase in rats exposed to cigarette smoke. *Toxicology*, 19:255-262.
26. Engelhardt, J. and Knebel, W. (1993): Leica TCS - Das Konfokale Laserscanning-Mikroskop der neuesten Generation; Technik und Anwendung. Mitteilungen für Wissenschaft und Technik X(5) 159-168..
27. Failli,P., Fazzini,A., Franconi,F., Stendardi,I., and Giotti,A. (1992): Taurine antagonizes the increase in intracellular calcium concentration induced by alpha-adrenergic stimulation in freshly isolated guinea-pig cardiomyocytes. *J.Mol.Cell Cardiol.*, 24:1253-1265.
28. Felix,S.B., Baumann,G., Ahmad,Z., Hashemi,T., Niemczyk,M., and Berdel,W.E. (1990): Effects of platelet-activating factor on myocardial contraction and myocardial relaxation of isolated perfused guinea pig hearts. *J.Cardiovasc.Pharmacol.*, 16:750-756.
29. Feuerstein,G., Boyd,L.M., Ezra,D., and Goldstein,R.E. (1984): Effect of platelet-activating factor on coronary circulation of the domestic pig. *Am.J.Physiol*, 246:H466-H471
30. Geerts,H., Nuydens,R., Nuyens,R., and Ver,D.L. (1989): The effect of flunarizine on intracellular calcium in isolated rat cardiomyocytes. A digital image processing study [published erratum appears in *Cardiovasc Res* 1989 Nov;23(11):992]. *Cardiovasc.Res.*, 23:797-806.
31. Goldstein,S., Landis,J.R., Leighton,R., Ritter,G., Vasu,C.M., Lantis,A., and Serokman,R. (1981): Characteristics of the resuscitated out-of-hospital cardiac arrest victim with coronary heart disease. *Circulation*, 64:977-984.
32. Graham,R.M., Strahan,M.E., Norman,K.W., Watkins,D.N., Sturm,M.J., and Taylor,R.R. (1994): Platelet and plasma platelet-activating factor in sepsis and myocardial infarction [see comments]. *J.Lipid Mediat.Cell Signal.*, 9:167-182.
33. Hanahan,D.J., Demopoulos,C.A., Liehr,J., and Pinckard,R.N. (1980): Identification of platelet activating factor isolated from rabbit basophils as acetyl glyceryl ether phosphorylcholine. *J.Biol.Chem.*, 255:5514-5516.
34. Haslam,R.J. and Vanderwel,M. (1982): Inhibition of platelet adenylate cyclase by 1-O-alkyl-2-O-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine (platelet-activating factor). *J.Biol.Chem.*, 257:6879-6885.
35. Henson,P.M. (1970): Release of vasoactive amines from rabbit platelets induced by antiplatelet antibody in the presence and absence of complement. *J.Immunol.*, 104:924-934.

36. Homma,H. and Hanahan,D.J. (1988): Attenuation of platelet activating factor (PAF)-induced stimulation of rabbit platelet GTPase by phorbol ester, dibutyryl cAMP, and desensitization: concomitant effects on PAF receptor binding characteristics. *Arch.Biochem.Biophys.*, 262:32-39.
37. Horackova,M. and Mapplebeck,C. (1989): Electrical, contractile, and ultrastructural properties of adult rat and guinea-pig ventricular myocytes in long-term primary cultures. *Can.J.Physiol Pharmacol.*, 67:740-750.
38. Hori,T., Yoshizumi,M., Kitagawa,T., Houchi,H., Oka,M., and Katoh,I. (1996): Mechanism of ATP-induced Ca<sup>2+</sup> efflux from freshly isolated adult rat cardiomyocytes: possible involvement of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange. *Tokushima J.Exp.Med.*, 43:127-134.
39. Howard,A., Barley,N.F., Legon,S., and Walters,J.R. (1994): Plasma-membrane calcium-pump isoforms in human and rat liver. *Biochem.J.*, 303:275-279.
40. Hwang,S.B. (1990): Specific receptors of platelet-activating factor, receptor heterogeneity, and signal transduction mechanisms. *J.Lipid Mediat.*, 2:123-158.
41. Inarrea,P., Gomez,C.J., Nieto,M., and Crespo,M.S. (1984): Characteristics of the binding of platelet-activating factor to platelets of different animal species. *Eur.J.Pharmacol.*, 105:309-315.
42. Izumi,T. and Shimizu,T. (1995): Platelet-activating factor receptor: gene expression and signal transduction. *Biochim.Biophys.Acta*, 1259:317-333.
43. Jackson,C.V., McGrath,G.M., and McNeill,J.H. (1986): Alterations in alpha 1-adrenoceptor stimulation of isolated atria from experimental diabetic rats. *Can.J.Physiol Pharmacol.*, 64:145-151.
44. Jacobson,K.A., Barone,S., Kammula,U., and Stiles,G.L. (1989): Electrophilic derivatives of purines as irreversible inhibitors of A1 adenosine receptors. *J.Med.Chem.*, 32:1043-1051.
45. Kamitani,T., Katamoto,M., Tatsumi,M., Katsuta,K., Ono,T., Kikuchi,H., and Kumada,S. (1984): Mechanism(s) of the hypotensive effect of synthetic 1-O-octadecyl-2-O-acetyl-glycero-3-phosphorylcholine. *Eur.J.Pharmacol.*, 98:357-366.
46. Koltai,M., Hosford,D., Guinot,P., Esanu,A., and Braquet,P. (1991): Platelet activating factor (PAF). A review of its effects, antagonists and possible future clinical implications (Part I). *Drugs*, 42:9-29.
47. Koltai,M., Hosford,D., Guinot,P., Esanu,A., and Braquet,P. (1991): PAF. A review of its effects, antagonists and possible future clinical implications (Part II). *Drugs*, 42:174-204.
48. Koltai,M., Tosaki,A., Hosford,D., Esanu,A., and Braquet,P. (1991): Effect of BN 50739, a new platelet activating factor antagonist, on ischaemia induced ventricular arrhythmias in isolated working rat hearts. *Cardiovasc.Res.*, 25:391-397.
49. Kono,T. (1969): Roles of collagenases and other proteolytic enzymes in the dispersal of animal tissues. *Biochim.Biophys.Acta*, 178:397-400.
50. Langendorff, O. (1895): Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen. *Pflügers Archiv der gesamten Physiologie* 61, 291-332..
51. Levi,R., Burke,J.A., Guo,Z.G., Hattori,Y., Hoppens,C.M., McManus,L.M., Hanahan,D.J., and Pinckard,R.N. (1984): Acetyl glyceryl ether phosphorylcholine (AGEPC). A putative mediator of cardiac anaphylaxis in the guinea pig. *Circ.Res.*, 54:117-124.
52. Ludwig,P., Holzhutter,H.G., Colosimo,A., Silvestrini,M.C., Schewe,T., and Rapoport,S.M. (1987): A kinetic model for lipoxygenases based on experimental data with the lipoxygenase of reticulocytes. *Eur.J.Biochem.*, 168:325-337.
53. Massey,C.V., Kohout,T.A., Gaa,S.T., Lederer,W.J., and Rogers,T.B. (1991): Molecular and cellular actions of platelet-activating factor in rat heart cells. *J.Clin.Invest*, 88:2106-2116.
54. McManus,L.M., Hanahan,D.J., Demopoulos,C.A., and Pinckard,R.N. (1980): Pathobiology of the intravenous infusion of acetyl glyceryl ether phosphorylcholine (AGEPC), a synthetic

platelet-activating factor (PAF), in the rabbit. *J.Immunol.*, 124:2919-2924.

55. McManus,L.M., Woodard,D.S., Deavers,S.I., and Pinckard,R.N. (1993): PAF molecular heterogeneity: pathobiological implications. *Lab Invest*, 69:639-650.
56. Mentz,P., Mentz,G., Giessler,C., and Mest,H.J. (1992): Interactions of prostanoids with the platelet activating factors. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids*, 47:13-16.
57. Mentz,P. and Giessler,C. (1992): Biosynthesis of TXB2 and 6-oxo-PGF1 alpha in the heart and other tissues under pathophysiological conditions. *Agents Actions Suppl*, 37:99-106.
58. Metha,P. and Metha,J. (1978): Platelet aggregation ratio in myocardial infarction [letter]. *Blut*, 37:51
59. Minta,A., Kao,J.P., and Tsien,R.Y. (1989): Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J.Biol.Chem.*, 264:8171-8178.
60. Montrucchio,G., Alloatti,G., Mariano,F., Tetta,C., Emanuelli,G., and Camussi,G. (1986): Cardiovascular alterations in the rabbit infused with platelet activating factor (PAF): effect of kadsurenone, a PAF-receptor antagonist. *Int.J.Tissue React.*, 8:497-504.
61. Mueller,H.W., O'Flaherty,J.T., Greene,D.G., Samuel,M.P., and Wykle,R.L. (1984): 1-O-alkyl-linked glycerophospholipids of human neutrophils: distribution of arachidonate and other acyl residues in the ether-linked and diacyl species. *J.Lipid Res.*, 25:383-388.
62. Mueller,H.W., O'Flaherty,J.T., and Wykle,R.L. (1984): The molecular species distribution of platelet-activating factor synthesized by rabbit and human neutrophils. *J.Biol.Chem.*, 259:14554-14559.
63. Muir,A.R., Kanji,A.H., and Allbrook,D. (1965): The structure of the satellite cells in skeletal muscle. *J.Anat.*, 99:435-444.
64. Nakaya,H. and Tohse,N. (1986): Electrophysiological effects of acetyl glyceryl ether phosphorylcholine on cardiac tissues: comparison with lysophosphatidylcholine and long chain acyl carnitine. *Br.J.Pharmacol.*, 89:749-757.
65. O'Flaherty,J.T., Surles,J.R., Redman,J., Jacobson,D., Piantadosi,C., and Wykle,R.L. (1986): Binding and metabolism of platelet-activating factor by human neutrophils. *J.Clin.Invest*, 78:381-388.
66. Pietsch,P., Hunger,T., Braun,M., Roediger,A., Baumann,G., and Felix,S.B. (1998): Effects of platelet-activating factor on intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration and contractility in isolated cardiomyocytes. *J.Cardiovasc.Pharmacol.*, 31:758-763.
67. Piper,H.M. (1989): Energy deficiency, calcium overload or oxidative stress: possible causes of irreversible ischemic myocardial injury. *Klin.Wochenschr.*, 67:465-476.
68. Piper,P.J. and Yaacob,H.B. (1989): Interactions of platelet activating factor, thromboxane A2 and leukotrienes in guinea-pig heart. *Prog.Clin.Biol.Res.*, 301:493-498.
69. Pollack,P.S., Carson,N.L., Nuss,H.B., Marino,T.A., and Houser,S.R. (1991): Mechanical properties of adult feline ventricular myocytes in culture. *Am.J.Physiol*, 260:H234-H241
70. Ramesha,C.S. and Pickett,W.C. (1987): Human neutrophil platelet-activating factor: molecular heterogeneity in unstimulated and ionophore-stimulated cells. *Biochim.Biophys.Acta*, 921:60-66.
71. Ramesha,C.S. and Pickett,W.C. (1987): Species-specific variations in the molecular heterogeneity of the platelet-activating factor. *J.Immunol.*, 138:1559-1563.
72. Robertson,D.A., Genovese,A., and Levi,R. (1987): Negative inotropic effect of platelet-activating factor on human myocardium: a pharmacological study. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 243:834-839.
73. Robertson,D.A., Wang,D.Y., Lee,C.O., and Levi,R. (1988): Negative inotropic effect of platelet-activating factor: association with a decrease in intracellular sodium activity [published erratum appears in *J Pharmacol Exp Ther* 1988 Sep;246(3):1201].

J.Pharmacol.Exp.Ther., 245:124-128.

74. Robertson,D.N., Coyle,A.J., Rhoden,K.J., Grandordy,B., Page,C.P., and Barnes,P.J. (1988): The effect of platelet-activating factor on histamine and muscarinic receptor function in guinea pig airways. *Am.Rev.Respir.Dis.*, 137:1317-1322.
75. Saeki,S., Masugi,F., Ogihara,T., Otsuka,A., Kumahara,Y., Watanabe,K., Tamura,K., Akashi,A., and Kumagai,A. (1985): Effects of 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (platelet activating factor) on cardiac function in perfused guinea-pig heart. *Life Sci.*, 37:325-329.
76. Santi,C.M., Conner,J.A., and Hernandez,C.A. (1995): A significant fraction of calcium transients in intact guinea pig ventricular myocytes is mediated by Na(+)-Ca2+ exchange. *Cell Signal.*, 7:803-820.
77. Satouchi,K., Oda,M., Yasunaga,K., and Saito,K. (1983): Application of selected ion monitoring to determination of platelet-activating factor. *J.Biochem.Tokyo*, 94:2067-2070.
78. Satouchi,K. (1983): [Platelet activating factor (PAF)--a new chemical mediator of inflammation]. *Seikagaku*, 55:160-166.
79. Satouchi,K., Oda,M., Yasunaga,K., and Saito,K. (1985): Evidence for production of 1-acyl-2-acetyl-sn-glyceryl-3-phosphorylcholine concomitantly with platelet-activating factor. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 128:1409-1417.
80. Schlondorff,D. (1989): Interactions of platelet activating factor and prostaglandins in the glomerulus and in mesangial cells. *Adv.Exp.Med.Biol.*, 259:199-219.
81. Siraganian,R.P. and Osler,A.G. (1971): Destruction of rabbit platelets in the allergic response of sensitized leukocytes. II. Evidence for basophil involvement. *J.Immunol.*, 106:1252-1259.
82. Siraganian,R.P. and Osler,A.G. (1971): Destruction of rabbit platelets in the allergic response of sensitized leukocytes. I. Demonstration of a fluid phase intermediate. *J.Immunol.*, 106:1244-1251.
83. Spurgeon,H.A., Stern,M.D., Baartz,G., Raffaelli,S., Hansford,R.G., Talo,A., Lakatta,E.G., and Capogrossi,M.C. (1990): Simultaneous measurement of Ca2+, contraction, and potential in cardiac myocytes. *Am.J.Physiol*, 258:H574-H586
84. Spurgeon,H.A., duBell,W.H., Stern,M.D., Sollott,S.J., Ziman,B.D., Silverman,H.S., Capogrossi,M.C., Talo,A., and Lakatta,E.G. (1992): Cytosolic calcium and myofilaments in single rat cardiac myocytes achieve a dynamic equilibrium during twitch relaxation. *J.Physiol Lond*, 447:83-102.
85. Stahl,G.L., Lefer,D.J., and Lefer,A.M. (1987): PAF-acether induced cardiac dysfunction in the isolated perfused guinea pig heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.*, 336:459-463.
86. Stahl,G.L. and Lefer,A.M. (1987): Mechanisms of platelet-activating factor-induced cardiac depression in the isolated perfused rat heart. *Circ.Shock*, 23:165-177.
87. Sturk,A., ten Cate,J.W., Hosford,D., Mencia-Huerta,J.M., and Braquet,P. (1989): The synthesis, catabolism, and pathophysiological role of platelet-activating factor. *Adv.Lipid Res.*, 23:219-276.
88. Suetake,I., Takisawa,H., and Nakamura,T. (1992): Contractile activity and fluorescence changes in fluo-3-loaded isolated ventricular myocytes. *Jpn.J.Physiol*, 42:815-821.
89. Tamura,K., Yoshida,S., Iwai,T., and Watanabe,I. (1992): Effects of isoprenaline and ouabain on cytosolic calcium and cell motion in single rat cardiomyocytes. *Cardiovasc.Res.*, 26:179-185.
90. Tanniere,Z.M., Rochette,L., and Bralet,J. (1989): PAF-acether-induced mortality in mice: protection by benzodiazepines. *Drugs Exp.Clin.Res.*, 15:553-558.
91. Touqui,L., Hatmi,M., and Vargaftig,B.B. (1985): Human platelets stimulated by thrombin

produce platelet-activating factor (1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine) when the degrading enzyme acetyl hydrolase is blocked. *Biochem.J.*, 229:811-816.

92. Touqui,L., Jacquemin,C., Dumarey,C., and Vargaftig,B.B. (1985): 1-O-alkyl-2-acyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine is the precursor of platelet-activating factor in stimulated rabbit platelets. Evidence for an alkylacetyl-glycerophosphorylcholine cycle. *Biochim.Biophys.Acta*, 833:111-118.
93. Triggiani,M., Schleimer,R.P., Tomioka,K., Hubbard,W.C., and Chilton,F.H. (1992): Characterization of platelet-activating factor synthesized by normal and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-primed human eosinophils. *Immunology*, 77:500-504.
94. Uhing,R.J., Prpic,V., Hollenbach,P.W., and Adams,D.O. (1989): Involvement of protein kinase C in platelet-activating factor-stimulated diacylglycerol accumulation in murine peritoneal macrophages. *J.Biol.Chem.*, 264:9224-9230.
95. Vahouny,G.V., Wei,R., Starkweather,R., and Davis,C. (1970): Preparation of beating heart cells from adult rats. *Science*, 167:1616-1618.
96. Valone,F.H., Coles,E., Reinhold,V.R., and Goetzl,E.J. (1982): Specific binding of phospholipid platelet-activating factor by human platelets. *J.Immunol.*, 129:1637-1641.
97. Valone,F.H. and Goetzl,E.J. (1983): Enhancement of human polymorphonuclear leukocyte adherence by the phospholipid mediator 1-O-hexadecyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine (AGEPC). *Am.J.Pathol.*, 113:85-89.
98. Valone,F.H. (1988): Platelet-activating factor binding and metabolism during human platelet aggregation. *Thromb.Res.*, 50:103-112.
99. Wang,H., Tan,X.D., Qu,X.W., Chang,H., Remick,D.G., Gonzalez,C.F., and Hsueh,W. (1997): Platelet-activating factor (PAF) up-regulates plasma and tissue PAF-acetylhydrolase activity in the rat: effect of cycloheximide. *Pediatr.Res.*, 42:597-603.
100. Williams,D.A., Delbridge,L.M., Cody,S.H., Harris,P.J., and Morgan,T.O. (1992): Spontaneous and propagated calcium release in isolated cardiac myocytes viewed by confocal microscopy. *Am.J.Physiol*, 262:C731-C742
101. Woodcock,E.A., Tanner,J.K., Fullerton,M., and Kuraja,I.J. (1992): Different pathways of inositol phosphate metabolism in intact neonatal rat hearts and isolated cardiomyocytes. *Biochem.J.*, 281:683-688.
102. Wykle,R.L., Malone,B., and Snyder,F. (1980): Enzymatic synthesis of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine, a hypotensive and platelet-aggregating lipid. *J.Biol.Chem.*, 255:10256-10260.
103. Yu,Z., Quamme,G.A., and McNeill,J.H. (1994): Depressed  $[Ca^{2+}]_i$  responses to isoproterenol and cAMP in isolated cardiomyocytes from experimental diabetic rats. *Am.J.Physiol*, 266:H2334-H2342
104. Zimmerman,A.N. and Hulsman,W.C. (1966): Paradoxical influence of calcium ions on the permeability of the cell membranes of the isolated rat heart. *Nature*, 211:646-647.

## Verzeichnis im Text häufig verwendeter Abkürzungen

A23187	4-Bromo-Kalziumionophor
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CLSM	konfokale Laserrastermikroskopie
DAG	Diazylglyzerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
GTP	Guanintriphosphat
GTPase	Guanintriphosphatase
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
IL	Interleukine
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
KHP	Krebs-Henseleit-Puffer
LT	Leukotriene
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
MAPKK	MAPK-Kinase
PAF	i.w. plättchenaktivierende Phospholipide
	i.e. 1-O-Alkyl-2-azetyl-sn-glyzero-3-phosphocholin
PIP <sub>2</sub>	Phosphoinositoldiphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLA	Phospholipase A
PLC	Phospholipase C
PMN	polymorphkernige Leukozyten
PTK	Proteintyrosinkinase
PTX	Pertussistoxin
TNF	Tumornekrosefaktor
TX	Thromboxane
WEB2170	spezifischer PAF-Rezeptorantagonist

## **Danksagung**

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. med. G. Baumann als Direktor der Medizinischen Klinik und Poliklinik I der Charité Campus Mitte für die Möglichkeit, im Kardiologischen Forschungslabor der Charité diese experimentelle Arbeit durchführen zu können.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. S. B. Felix für die interessante Aufgabenstellung und die immerwährende Hilfe und Anregung bei der Erstellung der Arbeit.

Viel Dank gebührt Herrn Dr. Peter Pietsch, der jederzeit vor Ort für mich ansprechbar war und die naturwissenschaftlichen und technischen Aspekte der Arbeit umfassend betreute.

Frau Angelika Westphal danke ich für die technische Assistenz und den immerwährenden fröhlichen Einsatz auch in kniffligen Situationen.

Zum Schluss danke ich den Lektoren für die fachlichen Anregungen, die mir bei der Niederschrift der Arbeit sehr geholfen haben.